



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102013012646-2 A2

(22) Data do Depósito: 22/05/2013

(43) Data da Publicação: 09/08/2016



(54) **Título:** COMPOSTO SULFONILIDRAZÔNICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DO COMPOSTO SULFONILIDRAZÔNICO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

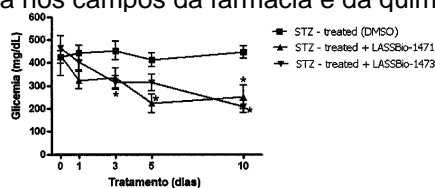
(51) **Int. Cl.:** C07C 251/86; C07C 309/32; C07C 249/16; A61K 31/10; A61K 31/15; (...)

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

(72) **Inventor(es):** FILIPE PEREIRA DA COSTA, ALOA MACHADO DE SOUZA, CLEMILSON BERTO JUNIOR, ELIEZER JESUS DE LACERDA BARREIRO, GISELE ZAPATA SUDO, MARGARETE MANHÃES TRACHEZ, ROBERTO TAKASHI SUDO

(74) **Procurador(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

(57) **Resumo:** COMPOSTO SULFONILIDRAZONICO, PROCESSO DE OBTENCAO DO COMPOSTO SULFONILIDRAZONICO E COMPOSIOQES FARMACEUTICAS A presente invengáo descreve um composto de fórmula (I), seu processo de obtengao e uso na fabricagao de uma composigao farmacéutica para estimular a produgáo de insulina. Especificamente, a presente invengao compreende uma série de sulfonilidrazonas que podem ser utilizadas na fabricagáo de uma composigao farmacéutica para tratar diabetes. A presente invengao se situa nos campos da farmacia e da quimica.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

COMPOSTO SULFONILIDRAZÔNICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DO
COMPOSTO SULFONILIDRAZÔNICO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS.

5 Campo da Invenção

A presente invenção descreve uma série de compostos que podem ser utilizados na preparação de composições farmacêuticas para estimular a produção de insulina ou diminuir a resistência dos tecidos a este hormônio. Especificamente, a presente invenção compreende uma série de
10 sulfonilidrazonas, seu processo de obtenção e uso na fabricação de uma composição farmacêutica para tratar diabetes. A presente invenção se situa nos campos da farmácia e da química.

Antecedentes da Invenção

15 O Diabetes Mellitus (DM) figura entre as enfermidades de maior impacto sobre a saúde coletiva. A prevalência dessa enfermidade vem aumentando exponencialmente tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Dados da OMS mostram que a incidência mundial atual do DM é de 194 milhões de pessoas e com previsão de que em 2025 o número de casos possa
20 chegar a mais de 330 milhões.

Os gastos mundiais com seu tratamento tem acompanhado a velocidade de crescimento da população mundial. Em 2007, foram gastos US\$ 232 bilhões para tratar e prevenir DM e suas complicações. Estudos prospectivos estimam que em 2025, esses gastos devam ultrapassar os US\$ 302,5 bilhões,
25 representando um dos maiores gastos mundiais em saúde.

No Brasil, o panorama observado com relação ao DM é extremamente preocupante. De acordo com a Federação Internacional do Diabetes, em 2007, o Brasil ocupava o oitavo lugar dentre os dez países com maior incidência de DM, com 6,9 milhões de pessoas acometidas (Tabela 1), representando 3,6%
30 da população do país. As estimativas apontam para uma piora desse quadro: subindo para quarto lugar em 2025 com 17,6 milhões de casos, perfazendo um

- total de 8,3% da população. Essa previsão de aumento deve-se, pelo menos em parte, ao aumento da expectativa de vida, gerando uma população com alto percentual de idosos com maior suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças crônicas. Soma-se a esse fato o estilo de vida sedentário e alimentação inadequada, os quais estão diretamente associados à obesidade, enfermidade que guarda estreita correlação com o desenvolvimento do DM (MISRA et al, 2012).

Tabela 1

Ranking de países em número de diabéticos					
2007			2025		
	País	Pessoas (em milhões)		País	Pessoas (em milhões)
1	Índia	40,9	1	Índia	69,9
2	China	39,8	2	China	59,3
3	EUA	19,2	3	EUA	25,4
4	Rússia	9,6	4	Brasil	17,6
5	Alemanha	7,4	5	Paquistão	11,5
6	Japão	7,0	6	México	10,8
7	Paquistão	6,9	7	Rússia	10,3
8	Brasil	6,9	8	Alemanha	8,1
9	México	6,1	9	Egito	7,6
10	Egito	4,4	10	Bangladesh	7,4

- Frente ao exposto, torna-se clara a necessidade pela busca de novas alternativas terapêuticas, objetivando uma melhoria no quadro mundial estabelecido para o DM. Nesse contexto, o planejamento racional para o desenvolvimento de novos fármacos surge como uma importante estratégia para a melhoria e inovação do arsenal farmacológico disponível para o tratamento do DM. Para tal é necessário que se compreenda o caráter multifatorial dessa doença e as bases fisiopatológicas do seu desenvolvimento.

Classificação e bases fisiopatológicas do *Diabetes Mellitus*

O Diabetes Mellitus (DM) consiste em um desequilíbrio metabólico multifatorial caracterizado pela diminuição da secreção ou resistência dos tecidos à insulina, levando a quadros de deficiência na produção e/ou liberação

da insulina. Pode ser classificado em tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2), diabetes mellitus gestacional (DMG) (TRIPATHI e SRIVASTAVA, 2006).

O DM1, que corresponde 5-10% dos casos, é resultado da destruição de células β pancreáticas com consequente resistência a insulina. Segundo a
5 Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Associação Americana de Diabetes (ADA) o DM1 pode ser causado por mecanismos autoimunes (DM1A) e por mecanismos idiopáticos, não autoimunes (DM1B) (TRIPATHI e SRIVASTAVA, 2006). Embora o DM1 possa acometer indivíduos de qualquer idade, manifesta-se, na maioria das vezes, na infância e na adolescência,
10 apresentando sintomas como aumento da diurese (poliúria), sensação de sede excessiva (polidipsia), polifagia (fome excessiva), perda de peso e cansaço (EMILIEN et al.,1999). A redução da massa de células β resulta em uma ausência parcial ou absoluta da secreção de insulina, a qual leva a um quadro hiperglicêmico, além de distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e
15 lipídeos. Por essa razão, grande parte dos indivíduos acometidos por este tipo de diabetes deve fazer uso constante de insulina exógena para sobreviver (TRIPATHI e SRIVASTAVA, 2006).

O DM gestacional é caracterizado por intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação, podendo ou
20 não persistir após o parto. Similar ao DM2, o DM gestacional é associado tanto à resistência à insulina quanto à diminuição da função das células β (KUHL, 1991). Outros tipos específicos de DM decorrem de defeitos genéticos e funcionais das células β , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino (pancreatite, neoplasia, hemocromatose, fibrose cística,
25 dentre outras), secundário a algumas endocrinopatias e secundário ao uso de alguns fármacos ou agentes químicos diabetogênicos (diuréticos, corticóides, betabloqueadores, contraceptivos, dentre outros) (KUHL, 1991).

O DM2 é a forma mais comum de DM e pode acometer entre 90-95% dos pacientes diabéticos. Apresenta intensa associação com excesso de peso
30 e, embora possa se manifestar em qualquer idade, aparece predominantemente em indivíduos com mais de 40 anos (EMILIEN et al.,1999).

Caracteriza-se por defeitos da ação da insulina em seus tecidos-alvo e na sua secreção. Em geral ambos os defeitos estão presentes quando a hiperglicemia se manifesta, porém pode haver predomínio de um deles. Os pacientes geralmente não são dependentes de insulina exógena para sobrevivência, porém podem necessitar de tratamento com insulina caso os níveis glicêmicos não atinjam a normalidade através de dieta ou uso de hipoglicemiantes orais (TRIPATHI e SRIVASTAVA, 2006).

Apesar de bem correlacionado com a obesidade e a alimentação inadequada, os fatores fisiológicos que determinam o desenvolvimento do DM2 ainda constituem importante objeto de investigação. Estudos recentes vem consolidando a hipótese de que a DM2 seja uma doença inflamatória crônica, estabelecendo-se pela manutenção de desequilíbrios metabólicos e funcionais iniciais, os quais induzem a liberação de diferentes mediadores, tais como citocinas inflamatórias (SAMUEL e SHULMAN, 2012). Nesse contexto, torna-se fundamental compreender a possível correlação entre a inflamação e a manifestação clínica do DM2.

Inflamação e Diabetes

As associações epidemiológicas entre inflamação e o DM2 iniciaram-se nos anos 1950-1960, quando foram encontrados, em pacientes diabéticos, níveis elevados de fibrinogênio e outros marcadores da ação inflamatória, como proteína C reativa, leucocitose, presença de ácido siálico. Posteriormente, foi demonstrada a associação desses marcadores com a resistência à insulina (SAMUEL e SHULMAN, 2012).

No início da doença a reação inflamatória resulta em um aumento de citocinas, incluindo a interleucina 1 β (IL1 β), a interleucina 6 (IL6) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), que apresentam uma inter-relação com as proteínas inflamatórias de fase aguda (PICARD e AUWERX, 2002). O TNF- α reduz a captação de glicose estimulada por insulina, sendo encontrado em altas concentrações em obesos e indivíduos insulino-resistentes. Com a evolução da doença, a persistência destas proteínas em níveis acima do normal representaria um estado de inflamação crônica leve, contribuindo para a

aterosclerose e outras complicações cardiovasculares associadas ao DM2 (PICARD e AUWERX, 2002).

Estudos recentes tem evidenciado o envolvimento dos receptores de ativação de proliferação peroxissomal (PPAR), descrito como regulador-chave do processo de adipogênese, como um integrador central do metabolismo de glicose e da homeostase energética. O mecanismo molecular, embora pouco conhecido, parece envolver TNF- α , o qual poderia mediar os efeitos de PPAR γ sobre a sensibilidade à insulina, enquanto PPAR β/δ está envolvido com uma via de inibição de NF κ B levando ao aumento da expressão de VCAM. Em um processo inflamatório mediado por LPS, PPAR α também leva a inibição de NF κ B, promovendo um aumento de proteínas de cunho inflamatório, IL-6 e IL-12.

Já foi descrito que a expressão de TNF- α é inibida pela ativação de PPAR γ em adipócitos e que essa redução de expressão poderia contribuir para a melhora do controle glicêmico (PICARD e AUWERX, 2002; DAYNES, 2002).

Esses achados, associados ao fato de alguns hipoglicemiantes orais, de alta eficácia terapêutica, apresentarem propriedade de agonista PPAR γ , apontam para esses receptores como alvos promissores no tratamento do DM2.

20 Diabetes Mellitus e Síndrome Metabólica

A primeira definição de síndrome metabólica (SM) foi postulada pelo National Cholesterol Education Program (NCEP), em 2001, e foi caracterizada por um grupo de sinais e sintomas que incluem a obesidade, a hipertensão, a dislipidemia e a resistência à insulina (National Cholesterol Education Program, 2001).

Nas últimas décadas, tem sido observado um aumento da incidência de doenças relacionadas à dieta e ao sedentarismo, tais como, doenças cardiovasculares e o DM2, as quais podem se manifestar como desdobramento da persistência do quadro de síndrome metabólica (MESHKANI e ADELI, 2009).

A terapia para o tratamento dessas alterações metabólicas consiste em medidas que retardem ou combatam a obesidade (processo inflamatório crônico), a hipertensão arterial, o aumento de fatores pró-coagulantes e a intolerância a glicose.

5 Existem algumas classes farmacológicas que tem sido descritas como uma terapia significativa no tratamento dessa síndrome, como por exemplo, os agonistas PPAR γ utilizados no tratamento e a prevenção das alterações metabólicas que resultam nessa síndrome, reduzindo o processo inflamatório e aumento à sensibilidade tecidual a insulina (KHOO, et al.,2012)

10 No DM2 há continua produção de insulina, entretanto, constata-se falha na captação de glicose pelos tecidos. Como consequência as células não metabolizam a glicose circulante no plasma, caracterizando uma síndrome conhecida como “resistência insulínica”. Fenômeno esse que é bem definido por um estado onde os tecidos desenvolvem uma redução da responsividade
15 aos níveis normais de insulina circulante, mantendo a glicemia desses pacientes acima de 75g/dL (SOUMAYA, 2012).

As complicações cardiovasculares constituem a principal causa de morbidade e mortalidade associada ao paciente diabético. As complicações crônicas secundárias à hiperglicemia prolongada e às alterações bioquímicas e
20 metabólicas observadas no diabetes, tais como anomalias micro e macro-vasculares e produtos de estresse oxidativo agravam a síndrome e expõem o paciente ao risco de desenvolver desordens letais, como cardiopatias isquêmicas, doença arterial periférica, hipertensão, disfunção endotelial, infarto do miocárdio e neuropatia periférica (MESHKANI e ADELI, 2009).

25 Neuropatia diabética

Dados epidemiológicos apontam o DM como uma das principais patologias que levam o desenvolvimento da neuropatia periférica. Está estabelecido que a hiperglicemia é o principal fator de risco para o desenvolvimento da neuropatia diabética, esse fato está relacionado à duração
30 da DM, mas questiona-se o quanto deste efeito pode estar relacionado a idade

do paciente, que por si só já é um fator de risco, assim como tabagismo, alcoolismo e hipertensão.

A incidência de neuropatia em indivíduos diabéticos é de aproximadamente 15% em pacientes com DM1 e de 20% com DM2. Essa
5 patologia assume uma peculiar importância quando observada uma taxa de mortalidade em dez anos de 27% entre indivíduos com neuropatia comparada com 5% entre indivíduos sem essa patologia.

Tratamento farmacológico

O tratamento farmacológico do diabetes deve ter como principal objetivo
10 a diminuição dos níveis plasmáticos de glicose, na tentativa de reduzir as possíveis complicações crônicas (GUYTON e HALL, 2006). O tratamento farmacológico do DM1 é realizado como base principalmente na insulino-terapia, enquanto o tratamento do DM2 é feito através da utilização de fármacos classificados como antidiabéticos orais ou hipoglicemiantes orais.
15 Essa classe é subdividida em: 1) fármacos que diminuem a absorção intestinal de glicose, tal como acarbose; 2) fármacos que estimulam a secreção de insulina, tais como sulfoniluréias e glinidas e 3) fármacos que diminuem a resistência a insulina/sensibilizadores tissulares, tais como metformina e tiazolinodionas ou glitazonas (BRUNTON et al., 2012).

20 Insulina

A insulina é um hormônio fundamental na regulação do metabolismo energético, o qual é produzido pelas células β das ilhotas pancreáticas a partir de um peptídeo precursor de 110 aminoácidos, a pré-pró-insulina. Após a translocação através da membrana do retículo endoplasmático, a região N-
25 terminal sinalizadora de 24 aminoácidos é clivada gerando a pró-insulina. Essa por sua vez, é translocada para o complexo de Golgi onde é armazenada em grânulos secretores, juntamente com a enzima que realiza sua clivagem em insulina.

A conversão de pró-insulina em insulina, consiste na remoção de 4
30 aminoácidos e do peptídeo conector (peptídeo C), produzindo as cadeias peptídicas A e B, compostas por 21 e 30 aminoácidos respectivamente, as

quais se mantêm unidas por duas pontes dissulfeto intercadeia. A clivagem se inicia no Golgi, continua nos grânulos e é praticamente completa no até o momento da sua secreção. Fato que resulta na liberação que quantidades equimolares de insulina e peptídeo C (GUYTON e HALL, 2006).

5 A insulina é o principal hormônio responsável pelo controle da captação, utilização e armazenamento dos nutrientes celulares. As ações anabólicas da insulina incluem a estimulação do armazenamento intracelular de glicose e a síntese de ácidos graxos, enquanto inibe processos catabólicos, como a degradação do glicogênio, lipídeos e proteínas (KHOO et al. 2012). Quando
10 liberada no plasma a insulina promove uma série de efeitos biológicos. Os tecidos-alvo importantes para a regulação da homeostasia da glicose pela insulina são o fígado, músculo e o tecido adiposo. Todavia, a insulina também exerce potentes efeitos reguladores sobre outros tipos de células.

Em muitos pacientes com DM2 e, principalmente, em pacientes com
15 DM1, indivíduos que tem deficiência na produção de insulina, existe a necessidade da reposição desse hormônio para a manutenção da homeostase. Para suprir essa demanda a terapia farmacológica utilizada é a administração de insulina exógena.

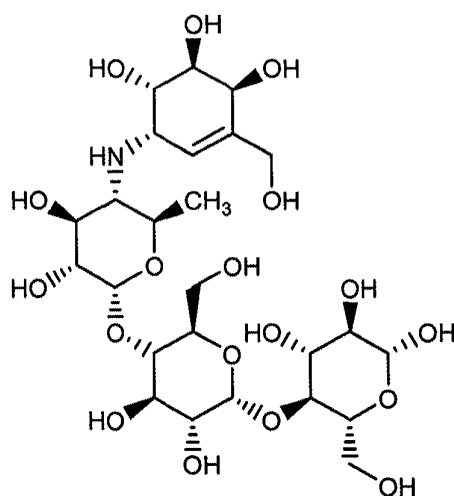
A insulina é majoritariamente administrada pela via subcutânea e suas
20 preparações podem ser classificadas, de acordo com: 1) a sua duração de ação, em preparações de ação curta, intermediária e longa e 2) as espécies de origem, em humana e suína. Atualmente, a insulina humana está amplamente disponível, resultado de sua produção pela tecnologia recombinante (BRUNTON et al., 2012). A insulina também pode ser associada com outros
25 fármacos anti-diabéticos para a obtenção de um maior controle sobre o perfil glicêmico (BRUNTON et al., 2012).

Redutores da absorção intestinal de glicose

Os inibidores da α -glicosidase reduzem a absorção intestinal de amido, dissacarídeos e dextrina por inibir a ação α -glicosidase na borda em escova do
30 intestino. A inibição dessa enzima retarda a absorção dos carboidratos, a elevação pós-prandial da glicose plasmática é atenuada tanto em indivíduos

normais quanto em diabéticos. As substâncias desta classe não produzem hipoglicemia, pois não modulam a liberação de insulina, podem ser considerados como monoterapia para pacientes com hiperglicemia predominantemente pós-prandial ou em idosos. Entretanto, são tipicamente utilizados em combinação com outros agentes antidiabéticos orais e/ou insulina (VAN GAAL, 2003).

O principal representante dessa classe é a acarbose (1), um oligossacarídeo de origem microbiana, que além dos efeitos citados acima pode melhorar significativamente os níveis de hemoglobina glicada (A1c) em paciente com DM2 que apresentam hiperglicemia grave. Entretanto, seu potencial de redução de glicose em pacientes com hiperglicemia leve a moderada corresponde a cerca de 30-50% do observado com outros antidiabéticos orais.



Acarbose (1)

Os inibidores da α -glicosidase tem como principais efeitos adversos relacionados com a dose, flatulência, diarreia, má absorção e distensão abdominal os quais podem ser reduzidos com o aumento gradativo da dose do fármaco. A reduzida eficácia, e os efeitos adversos característicos reduzem significativamente a adesão dos pacientes ao tratamento com essa classe de antidiabéticos (BRUNTON et al., 2012).

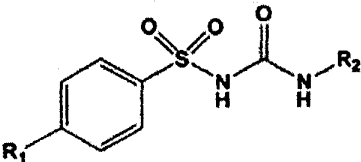
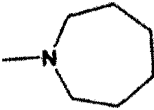
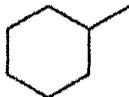
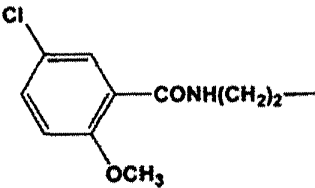
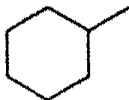
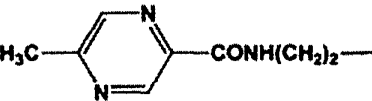
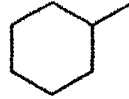
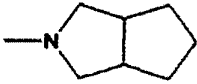
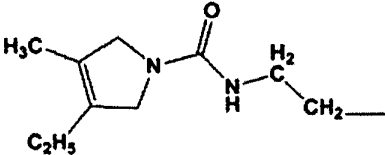
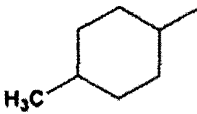
Secretagogos

São incluídos nessa classe farmacológica fármacos que tem como mecanismo de ação o estímulo da liberação de insulina, através do bloqueio de canais de K^+ sensíveis a ATP nas células β pancreáticas, de forma semelhante aos secretagogos fisiológicos. A redução da condutância do K^+ provoca
5 despolarização da membrana celular promovendo a abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem, influxo de Ca^{2+} e consequente liberação dos grânulos contendo insulina (Figura 5). Essa classe é subdividida em sulfoniluréias e meglitinidas (BRUNTON et al., 2012).

Sulfoniluréias

10 Todos os membros dessa classe são arilsulfoniluréias substituídas. Elas diferem por substituição na posição *para* do anel benzênico e em pela presença do substituinte conectado ao nitrogênio da unidade uréia. São divididas em duas gerações sendo tobutamida (2), acetoexamida (3), tolazamida (4) e clorpropamida (5) de primeira geração, e glibenclamida (6),
15 glipizida (7), glicazida (8) e glimepirida (9) de segunda geração (Tabela 2).

Tabela 2

Fórmula Geral		
		
<i>Agentes de primeira geração</i>	R1	R2
Tolbutamida	H ₃ C—	C ₄ H ₉ — (2)
Clorpropamida	Cl—	C ₃ H ₇ — (3)
Tolazamida	H ₃ C—	 (4)
Acetoexamida	H ₃ CCO—	 (5)
<i>Agentes de segunda geração</i>	R1	R2
Glibenclamida		 (6)
Glipizida		 (7)
Glicazida	H ₃ C—	 (8)
Glimepirida		 (9)

As sulfoniluréias apresentam espectros de ação similares, portanto diferindo principalmente em suas propriedades farmacocinéticas. É importante destacar que as sulfoniluréias de segunda geração apresentam potência hipoglicemiante significativamente superior as de primeira geração (BRUNTON et al., 2012).

A administração aguda de sulfoniluréias em pacientes com DM2, além de aumentar a liberação de insulina pelo pâncreas reduz a depuração hepática do hormônio, potencializando o aumento da insulina plasmática. Também são observados estímulo da liberação de somatostatina e redução da secreção de glucagon (GOODMAN e GILMAN, 2010).

Os níveis plasmáticos de insulina de jejum e as resposta de insulina a cargas orais de glicose ficam aumentados nos primeiros meses de tratamento. Todavia, com a administração crônica os níveis circulantes de insulina declinam para os observados antes do tratamento, enquanto os níveis diminuídos de glicose são mantidos.

Este efeito pode estar relacionado com a redução da glicose plasmática, permitindo que a insulina circulante exerça seus efeitos de modo mais efetivo sobre os tecidos-alvo e com o fato da hiperglicemia crônica comprometer a liberação de insulina. A ausência de estímulos de liberação aguda durante o tratamento crônico tem sido atribuída a uma *downregulation* dos canais de K⁺ modulados pelas sulfoniluréias nas células β pancreáticas (BRUNTON et al., 2012).

Os efeitos adversos são infrequentes, ocorrendo em cerca de 4% dos pacientes tratados com agentes de primeira geração e ligeiramente menor nos tratados com agentes de segunda geração. Podem causar reações hipoglicêmicas, incluindo coma, particularmente em pacientes idosos ou com comprometimento das funções renal e hepática. Outros efeitos colaterais incluem náuseas, vômitos, icterícia colestática, agranulocitose, anemias aplástica e hemolítica, reações de hipersensibilidade generalizada e reações dermatológicas. Cerca de 10 a 15% dos pacientes que utilizam esses fármacos

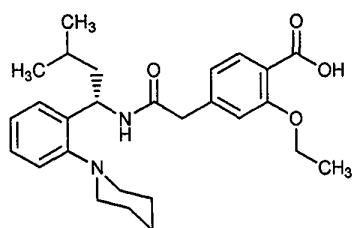
desenvolvem reação de sensibilidade ao etanol, semelhante ao dissulfiram pelo quadro de hipocalemia. (BRUNTON et al., 2012).

Meglitinidas

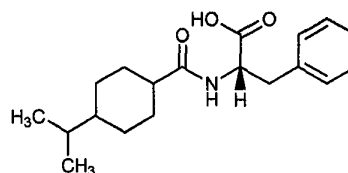
É uma classe de secretagogos que possui um mecanismo de ação semelhante ao das sulfoniluréias, ou seja, também promove a liberação de insulina pelo fechamento dos canais de potássio sensíveis a ATP nas células β pancreáticas, mas que não seguem o mesmo padrão estrutural das sulfoniluréias. Tem como principais representantes a repaglinida e nateglinida (BRUNTON et al., 2012).

A repaglinida (10) é um derivado do ácido benzóico de rápida absorção intestinal e é metabolizado majoritariamente no fígado. Como uma pequena proporção da repaglinida é metabolizada pelos rins, qualquer aumento na dose do fármaco em pacientes com insuficiência renal deve ser feito com cautela. A exemplo das sulfoniluréias, o principal efeito adverso da repaglinida é a hipoglicemia (BRUNTON et al., 2012).

A nateglinida (11) difere da repaglinida por ser um derivado da *D*-fenilalanina. Esse fármaco promove uma secreção de insulina mais rápida que os outros fármacos, porém seus efeitos são menos duradouros que os outros antidiabéticos orais. A principal aplicação terapêutica da nateglinida é na redução da glicemia pós-prandial em pacientes com DM2. Assim como os outros representantes da classe, a nateglinida também pode causar hipoglicemia.



Repaglinida (10)



Nateglinida (11)

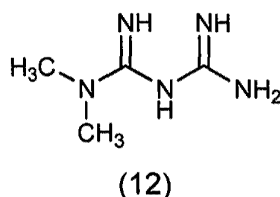
Biguanidas

A metformina (12) é atualmente o único representante dessa classe no mercado. Diferente dos secretagogos, por ser considerada anti-hiperglicêmica

e não hipoglicemiante e não induz a liberação de insulina pelas células β pancreáticas (BRUNTON et al., 2012).

Esse fármaco tem como mecanismo de ação a diminuição da produção hepática de glicose e a potencialização da ação da insulina no músculo esquelético e no tecido adiposo promovendo a redução dos níveis plasmáticos de glicose. Em nível molecular, suas ações são mediadas, pelo menos em parte, pela ativação de uma cinase celular, a proteína cinase ativada por AMP (AMPK). (BRUNTON et al., 2012)

Os pacientes com comprometimento renal, falência hepática, insuficiência cardíaca exigindo terapia farmacológica, doença pulmonar hipóxica crônica e histórico de acidose láctica devem evitar o uso da metformina.

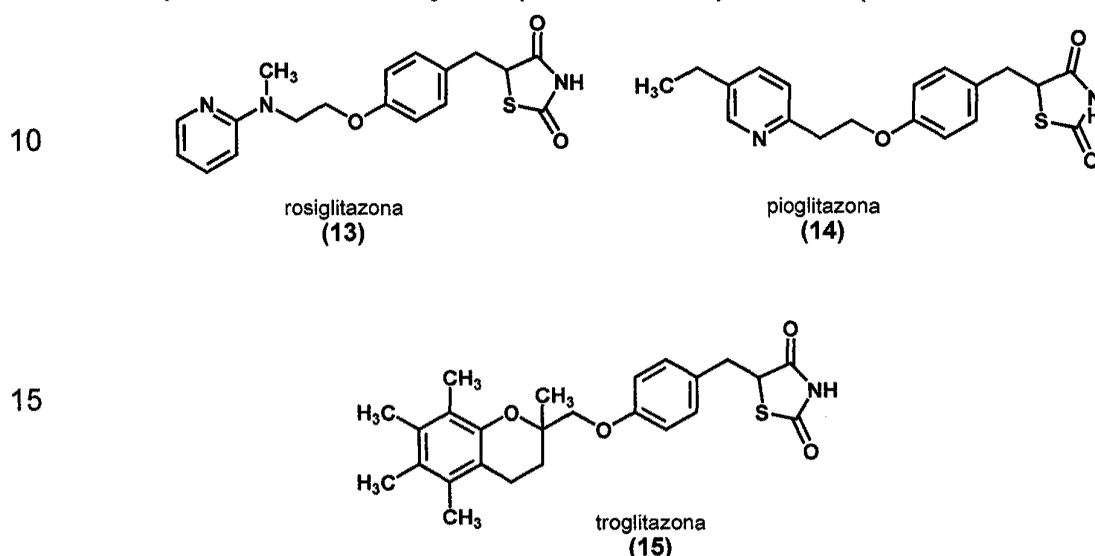


15 Tiazolidinodionas (Glitazonas)

A tiazolidinodionas (TZD) são agonistas do subtipo γ do receptor ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPAR γ), o qual ativa os genes que respondem a insulina e regulam o metabolismo dos carboidratos e lipídios (WHITEHEAD, 2011).

Essa classe age principalmente aumentando a sensibilidade a insulina nos tecidos periféricos, e assim, aumentam o transporte de glicose para o músculo e tecido adiposo, intensificando a síntese e a translocação das formas específicas dos transportadores de glicose. Igualmente ativam os genes que regulam o metabolismo dos ácidos graxos no tecido periférico. Algumas ações periféricas podem ser secundárias ao estímulo de liberação de adiponectina pelos adipócitos. A adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina, ao que consta, pelo aumento da AMP cinase, que estimula o transporte da glicose para o músculo e aumenta a oxidação dos ácidos graxos (WHITEHEAD, 2011).

Os principais representantes desta classe são a rosiglitazona, a troglitazona e a pioglitazona. Cabe ressaltar que a troglitazona e a rosiglitazona foram retiradas do mercado por apresentarem hepatotoxicidade e cardiotoxicidade, respectivamente. A pioglitazona ainda reside no mercado, mas por apresentar efeitos hepatotóxicos, apenas deve ser indicada aos pacientes que não responderem a nenhum outro antidiabético, e com acompanhamento da função hepática desses pacientes (WHITEHEAD, 2011).



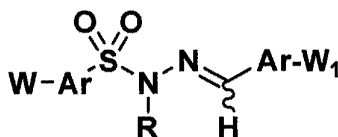
A literatura patentária também possui exemplos de compostos úteis no tratamento de diabetes. Podemos citar o US 8314247, que descreve derivados de hidrazonas capazes de inibir a glucokinase. Já o documento WO 2010/132615 descreve hidrazonas úteis no tratamento da diabetes, os quais são inibidores da proteína TRPM5, um canal catiônico. Pode-se citar também o documento US 5213608, que descreve compostos sulfonilamidino-hidrazônicos para uso como herbicidas. No entanto, nenhum destes documentos descreve ou sequer sugere os compostos sulfonilhidrazônicos da presente invenção.

Portanto, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

Neste contexto, uma nova série de derivados sulfonilidrazônicos funcionalizados foram desenhados aplicando-se estratégias de modificação molecular, a exemplo de bioisosterismo não clássico de abertura e fechamento de anéis, bioisosterismo de grupos funcionais, bioisosterismo clássico de anéis e homologação, sobre a estrutura dos protótipos LASSBio-1471 e LASSBio-1473. Os compostos desenhados e sintetizados mostraram importante efeito hipoglicemiante em distintos modelos farmacológicos, sendo eficazes no tratamento da neuropatia diabética.

É um objeto da presente invenção, um composto sulfonilidrazônico da fórmula (I):



Fórmula I

em que

Ar é pelo menos um dentre fenila, benzila, piridina, pirimidina, piridazina, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, naftila, fenilpirazol, imadazolopiridina, imidazola, pirazola, triazola, tetrazola, pirrola, tiofeno, furano, isozaxola, tiadiazola ou tiazol, onde todos são opcionalmente substituídos com um ou mais substituintes escolhidos dentre W e W1;

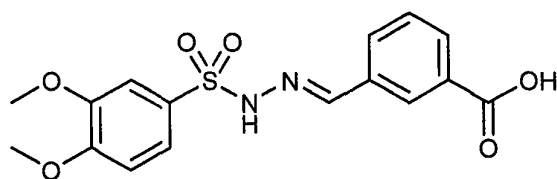
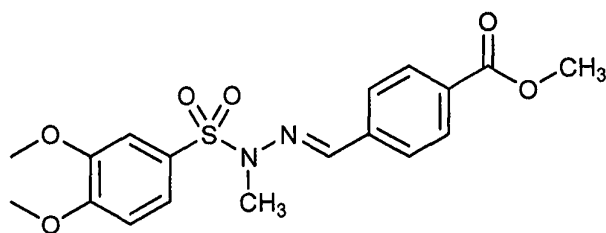
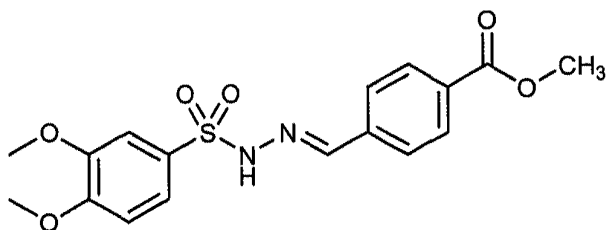
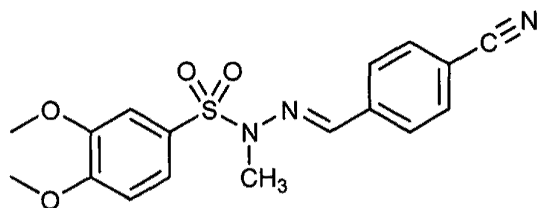
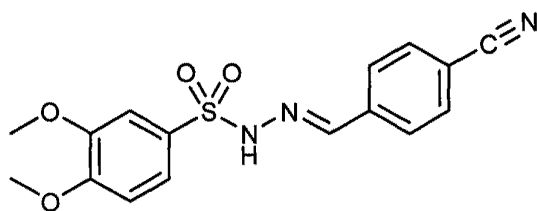
W é pelo menos um dentre H, F, Cl, Br, OCH₃, OH, OCF₃, CH₃, C₂H₅, CH(CH₃)₂, CF₃, CN, NO₂, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, NHCH(CH₃)₂, NHC(CH₃)₃, N(C₂H₅)₂, CO₂CH₃, CO₂Et, CO₂H, SO₃H, SO₂NH₂, SO₂NHCH₃, NH₂SO₂CH₃, SO₂CH₃, CONH₂, CONHCH₃, ou COCH₂SO₂CH₃, em posição *orto* ou *meta* ou *para* dos anéis aromáticos de Ar;

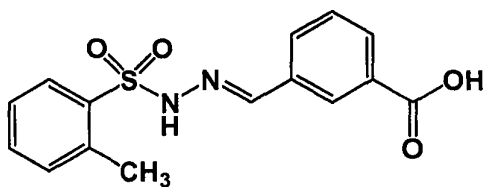
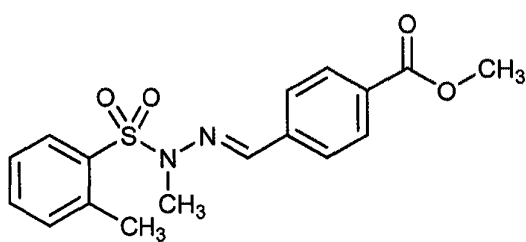
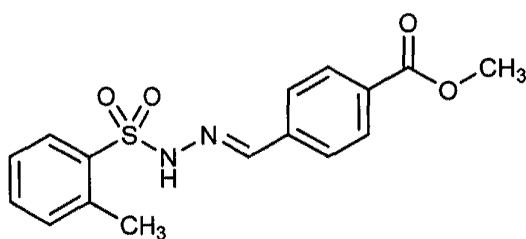
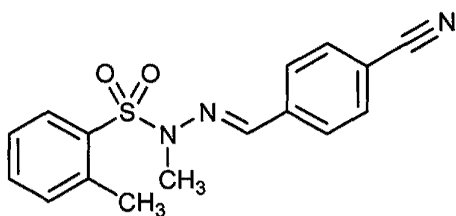
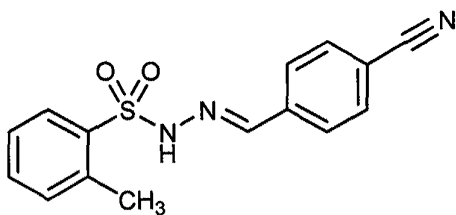
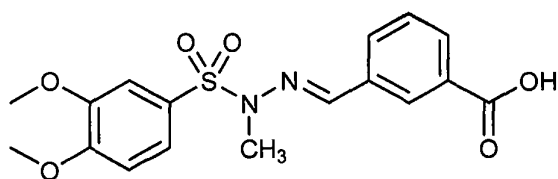
W1 é pelo menos um dentre H, F, Cl, Br, OCH₃, OH, OCF₃, CH₃, C₂H₅, CH(CH₃)₂, CF₃, CN, NO₂, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, NHCH(CH₃)₂, NHC(CH₃)₃, N(C₂H₅)₂, CO₂CH₃, CO₂Et, CO₂H, SO₃H, SO₂NH₂, SO₂NHCH₃, NH₂SO₂CH₃,

SO₂CH₃, CONH₂, CONHCH₃, COCH₂SO₂CH₃, Ph, benzila ou toluidina, em posição *orto* ou *meta* ou *para* dos anéis aromáticos de Ar;

R é pelo menos um dentre H, alquila alifática (linear ou ramificada) contendo até 10 átomos de carbono, benzila, fenila, cicloalquila (C₃-C₆), CH₂-cicloalquila (C₃-C₆).

Em uma realização preferencial, o composto sulfonilidrazônico da presente invenção é selecionado dentre o grupo que compreende:

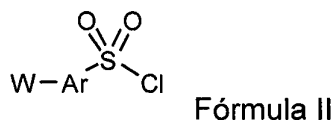




5

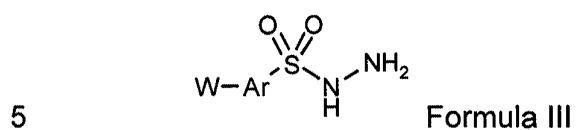
É ainda objeto da presente invenção, um processo de obtenção do composto sulfonilidrazônico que compreende as etapas de:

a) reação de um cloreto de sulfonila de fórmula II:



com hidrazina; e

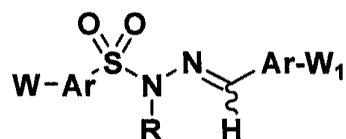
b) reação da sulfonylhydrazide obtida em a) de fórmula III



com um aldeído de fórmula IV;



10 visando obter a sulfonylhydrazone de fórmula I



Fórmula I

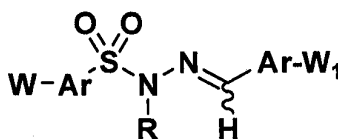
desde que quando R for diferente de H, o processo compreende uma etapa adicional de N-alkilação que ocorre:

- 15
- c.1) no composto de fórmula III obtido entre a etapa a) e a etapa b); ou
 - c.2) no composto de fórmula I, obtido após a etapa a).

onde W, W₁, Ar e R são conforme definidos anteriormente.

É um adicional objeto da presente invenção uma composição farmacêutica compreendendo:

a) um composto sulfonylhydrazonic de fórmula (I):



Fórmula I

em que

Ar é pelo menos um dentre fenila, benzila, piridina, pirimidina, piridazina, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, naftila, fenilpirazol, imadazolopiridina, imidazola, pirazola, triazola, tetrazola, pirrola, tiofeno, furano, isozaxola, tiadiazola ou tiazol, onde todos são opcionalmente substituídos com um ou mais substituintes escolhidos dentre W e W₁;

W é pelo menos um dentre H, F, Cl, Br, OCH₃, OH, OCF₃, CH₃, C₂H₅, CH(CH₃)₂, CF₃, CN, NO₂, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, NHCH(CH₃)₂, NHC(CH₃)₃, N(C₂H₅)₂, CO₂CH₃, CO₂Et, CO₂H, SO₃H, SO₂NH₂, SO₂NHCH₃, NHSO₂CH₃, SO₂CH₃, CONH₂, CONHCH₃, ou COCH₂SO₂CH₃, em posição *orto* ou *meta* ou *para* dos anéis aromáticos de Ar;

W₁ é pelo menos um dentre H, F, Cl, Br, OCH₃, OH, OCF₃, CH₃, C₂H₅, CH(CH₃)₂, CF₃, CN, NO₂, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, NHCH(CH₃)₂, NHC(CH₃)₃, N(C₂H₅)₂, CO₂CH₃, CO₂Et, CO₂H, SO₃H, SO₂NH₂, SO₂NHCH₃, NHSO₂CH₃, SO₂CH₃, CONH₂, CONHCH₃, COCH₂SO₂CH₃, Ph, benzila ou toluidina, em posição *orto* ou *meta* ou *para* dos anéis aromáticos de Ar;

R é pelo menos um dentre H, alquila alifática (linear ou ramificada) contendo até 10 átomos de carbono, benzila, fenila, cicloalquila (C₃-C₆), CH₂-cicloalquila (C₃-C₆); e

b) um veículo farmaceuticamente aceitável.

É ainda objeto da presente invenção, o uso da composição farmacêutica para modular a síndrome metabólica, característica do DM2, através da atividade agonista de receptores PPAR-γ e modular a produção de citocinas inflamatórias (e.g. TNFα e IL-1β).

Breve Descrição das Figuras

A figura 1 mostra a análise do perfil glicêmico em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina.

A figura 2 mostra o estabelecimento do diabetes mellitus após tratamento com estreptozotocina.

5 A figura 3 mostra uma análise do perfil glicêmico de ratos diabéticos após tratamento com os compostos sintetizados.

A figura 4 mostra uma análise do perfil glicêmico de ratos diabéticos após tratamento com diferentes compostos.

10 A figura 5 mostra uma validação do modelo de hiperglicemia em peixe-zebra.

A figura 6 mostra o efeito de insulina sobre a glicemia em modelo de peixe-zebra.

A figura 7 mostra o efeito de glibenclamida sobre a glicemia em modelo de peixe-zebra.

15 A figura 8 mostra o efeito de pioglitazona sobre a glicemia em modelo de peixe-zebra.

A figura 9 mostra o efeito de lassbio-1773 sobre a glicemia em modelo de peixe-zebra.

20 A figura 10 mostra o efeito de lassbio-1774 sobre a glicemia em modelo de peixe-zebra.

A figura 11 mostra redução percentual da glicemia em peixes-zebra hiperglicêmicos.

A figura 12 e a figura 13 mostram uma comparação do perfil temporal de diferentes tratamentos sobre a glicemia de peixes-zebra hiperglicêmicos.

25 A figura 14 mostra uma avaliação do perfil antiinflamatório de lassbio-1773 e lassbio 1774.

A figura 15 mostra uma avaliação da modulação da expressão de mRNA de adiponectina.

30 A figura 16 mostra uma avaliação da modulação da expressão de mRNA de leptina.

A figura 17A e 17B mostram a instauração do quadro de neuropatia periférica diabética.

A figura 18

5 Descrição Detalhada da Invenção

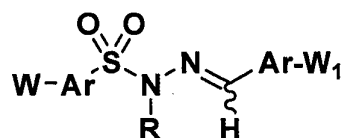
Os exemplos mostrados a seguir tem o intuito apenas de ilustrar alguns dos inúmeros modos de se realizar a invenção, não devendo ser encarados de forma restritiva, mas sim meramente ilustrativa.

Em face aos estudos que sugerem o benefício terapêutico do controle e tratamento do DM2 a partir da associação entre hipoglicemiantes orais e anti-inflamatórios e considerando a experiência do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®) na descoberta de novos protótipos de fármacos anti-inflamatórios, foram propostos em âmbito do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fármacos e Medicamentos (INCT-INOVAR), estudos para a descoberta de novos antidiabéticos duais, com o objetivo de controlar a síndrome metabólica, característica do DM2 ou DM1, através da atividade moduladora da via do PPAR- γ e/ou ativadora destes receptores, além de controlar as alterações inflamatórias decorrentes do DM, modulando citocinas inflamatórias (e.g. $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$).

20

COMPOSTO SULFONILIDRAZÔNICO

No presente pedido de patente, é definido um composto sulfonilidrazônico da fórmula (I):



Fórmula I

25

em que

Ar é pelo menos um dentre fenila, benzila, piridina, pirimidina, piridazina, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, naftila, fenilpirazol, imadazolopiridina,

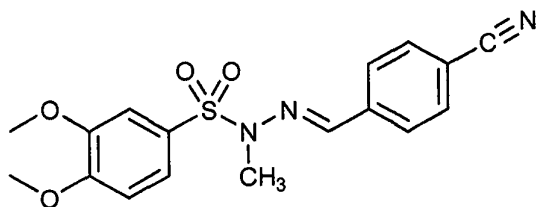
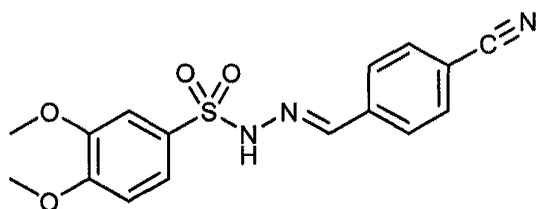
imidazola, pirazola, triazola, tetrazola, pirrola, tiofeno, furano, isozaxola, tiadiazola ou tiazol; onde todos são opcionalmente substituídos com um ou mais substituintes escolhidos dentre W e W1;

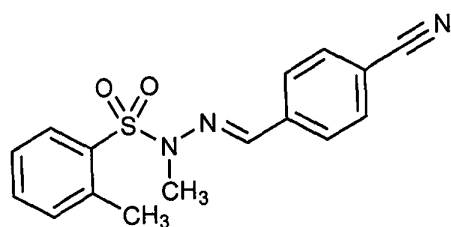
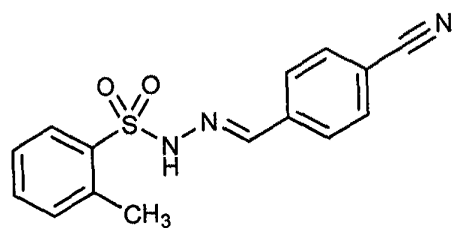
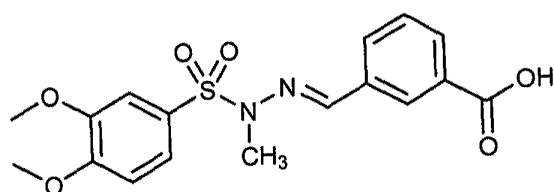
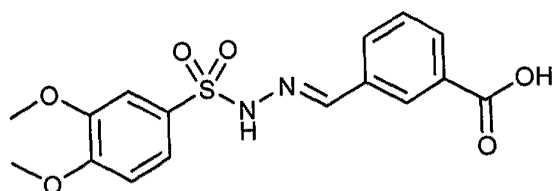
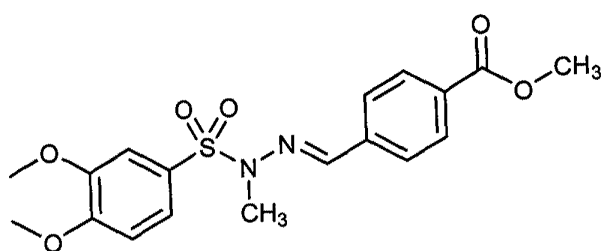
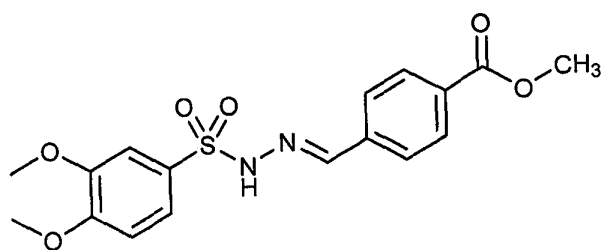
W é pelo menos um dentre H, F, Cl, Br, OCH₃, OH, OCF₃, CH₃, C₂H₅,
 5 CH(CH₃)₂, CF₃, CN, NO₂, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, NHCH(CH₃)₂, NHC(CH₃)₃,
 N(C₂H₅)₂, CO₂CH₃, CO₂Et, CO₂H, SO₃H, SO₂NH₂, SO₂NHCH₃, NHSO₂CH₃,
 SO₂CH₃, CONH₂, CONHCH₃, ou COCH₂SO₂CH₃, em posição *orto* ou *meta* ou
para dos anéis aromáticos de Ar;

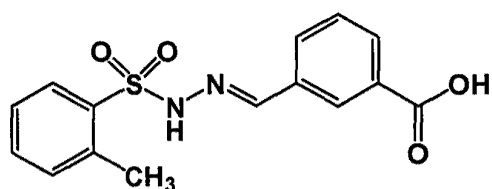
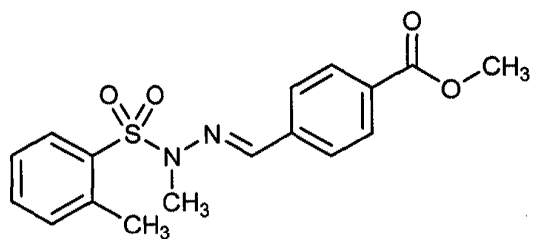
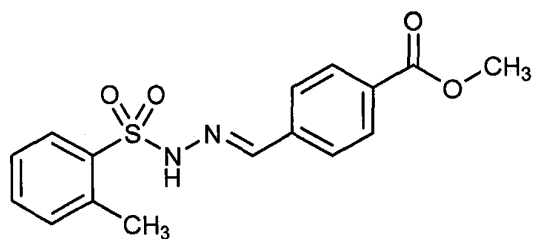
W1 é pelo menos um dentre H, F, Cl, Br, OCH₃, OH, OCF₃, CH₃, C₂H₅,
 10 CH(CH₃)₂, CF₃, CN, NO₂, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, NHCH(CH₃)₂, NHC(CH₃)₃,
 N(C₂H₅)₂, CO₂CH₃, CO₂Et, CO₂H, SO₃H, SO₂NH₂, SO₂NHCH₃, NHSO₂CH₃,
 SO₂CH₃, CONH₂, CONHCH₃, COCH₂SO₂CH₃, Ph, benzila ou toluidina, em
 posição *orto* ou *meta* ou *para* dos anéis aromáticos de Ar;

R é pelo menos um dentre H, alquila alifática (linear ou ramificada)
 15 contendo até 10 átomos de carbono, benzila, fenila, cicloalquila (C₃-C₆), CH₂-
 cicloalquila (C₃-C₆).

Preferencialmente, o composto sulfonilidrazônico é selecionado do grupo
 que compreende:



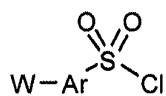




5 PROCESSO DE OBTENÇÃO DO COMPOSTO SULFONILIDRAZÔNICO

O processo de obtenção do composto sulfonilidrazônico compreende as etapas de:

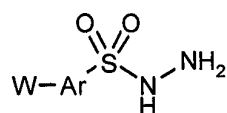
a) reação de um cloreto de sulfonila de fórmula II:



Fórmula II

10 com hidrazina; e

b) reação da sulfonilidrazida obtida em a) de fórmula III



Formula III

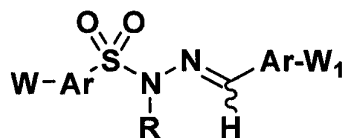
com um aldeído de fórmula IV;

15



Fórmula IV

visando obter a sulfonilhidrazona de fórmula I



Fórmula I

desde que quando R for diferente de H, o processo compreende uma etapa
5 adicional de N-alquilação que ocorre:

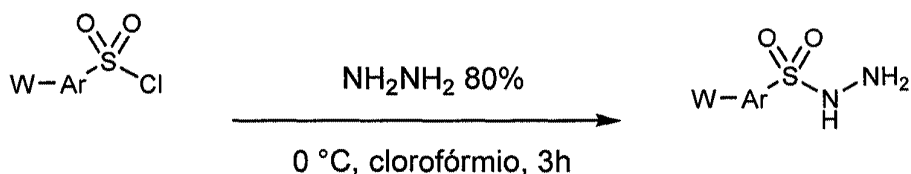
c.1) no composto de fórmula III obtido entre a etapa a) e a etapa b); ou

c.2) no composto de fórmula I, obtido após a etapa a).

onde W, W₁, Ar e R são conforme definidos anteriormente.

10 De maneira geral, o processo de obtenção das sulfonilhidrazonas da presente invenção compreende as seguintes reações:

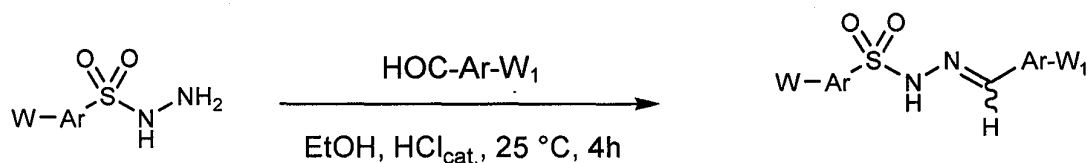
Método geral A – Síntese das sulfonilhidrazidas



15 A uma solução de cloreto de sulfonila em clorofórmio a 0 °C, sob agitação constante, foi adicionado a hidrazina, gota à gota, durante 5 minutos. Após o término, observado por cromatografia em camada fina (CCF) (aproximadamente 3 horas), a reação foi isolada com clorofórmio e lavada 3x com solução saturada de NaCl. O solvente foi evaporado e o produto foi obtido sem necessidade de purificação para uso nas reações subsequentes.

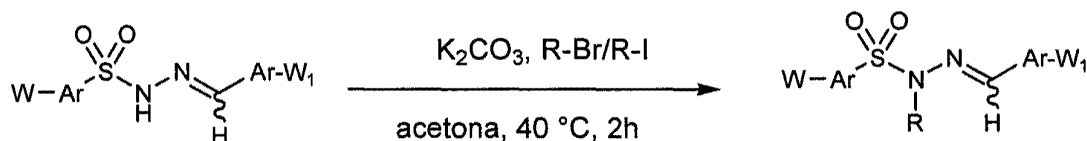
20

Método geral B – Síntese das sulfonilhidrazonas



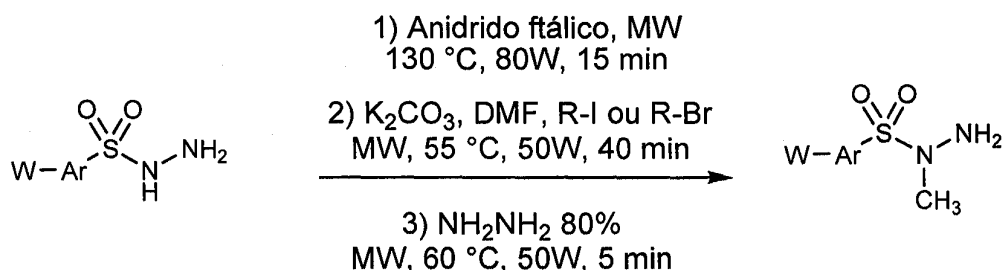
- 5 A uma solução da sulfonil hidrazida em etanol absoluto à temperatura ambiente, sob agitação constante, foi adicionado o aldeído. Após a solubilização do aldeído, foram adicionados 2 gotas de HCl 37%. Após o término, observado por CCF (aproximadamente 4 horas), o precipitado formado foi filtrado à vácuo e lavado com éter de petróleo, fornecendo a sulfonil hidrazona correspondente. Quando necessário, o produto foi purificado por recristalização em mistura de etanol/água.

10 Método geral C – N-alkilação das sulfonilhidrazonas



- 15 A uma solução de sulfonilhidrazona (1eq) em acetona foi adicionado K_2CO_3 (1.2 eq) e haleto de alquila correspondente (1eq). A reação foi acoplada a um condensador e aquecida até 40°C , sob agitação constante e vigorosa. Após o término, observado por CCF (aproximadamente 2 horas), a acetona foi evaporada e, ao sólido residual, foi adicionado etanol. A suspensão foi vertida em gelo e, a esse sistema, foram adicionadas 3 gotas de NaHSO_3 . O precipitado formado foi filtrado à vácuo, fornecendo a sulfonilhidrazona N-alkiladas correspondentes.
- 20

Método geral D – N-alkilação das sulfonilhidrazidas



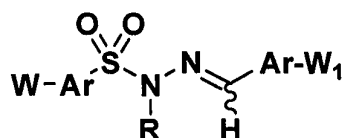
Uma mistura de sulfonilidrazida e anidrido ftálico foi colocada em reator de microondas num sistema aberto a 130 °C por 15 minutos, sob uma potência de 80W. Em seguida, adicionou-se à mistura reacional K₂CO₃ (1.2 eq), DMF e haleto de alquila (1eq), e esta foi novamente colocada em reator de microondas por 40 minutos a 55 °C, sob potencia de 50W. Logo após, o solvente foi evaporado e adicionou-se etanol e hidrato de hidrazina 80%. Novamente, a mistura reacional foi levada a reator de microondas a 60 °C por 5 minutos, sob 50W de potência. Determinado o término da reação por CCF, o produto foi purificado em coluna de sílica utilizando acetato de etila:hexano 30:70 como fase móvel.

Dessa forma, pode-se combinar as etapas descritas acima de forma a produzir os compostos de fórmula (I). Mais especificamente, caso seja desejado um composto de fórmula (I) onde R é H, pode-se utilizar as etapas A e B. Caso seja desejado um composto de fórmula (I) onde R é diferente de H, pode-se utilizar as etapas A, B e C, ou então as etapas A, D e B, onde o composto de partida de B é o produto de D ou apenas as etapas A e D.

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

20 A composição farmacêutica da presente invenção compreende:

a) um composto sulfonilidrazônico de fórmula (I):



Fórmula I

em que

Ar é pelo menos um dentre fenila, benzila, piridina, pirimidina, piridazina, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, naftila, fenilpirazol, imadazolopiridina, imidazola, pirazola, triazola, tetrazola, pirrola, tiofeno, furano, isozaxola, tiadiazola ou tiazol, onde todos são opcionalmente substituídos com um ou mais substituintes escolhidos dentre W e W1;

W é pelo menos um dentre H, F, Cl, Br, OCH₃, OH, OCF₃, CH₃, C₂H₅, CH(CH₃)₂, CF₃, CN, NO₂, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, NHCH(CH₃)₂, NHC(CH₃)₃, N(C₂H₅)₂, CO₂CH₃, CO₂Et, CO₂H, SO₃H, SO₂NH₂, SO₂NHCH₃, NH₂SO₂CH₃, SO₂CH₃, CONH₂, CONHCH₃, ou COCH₂SO₂CH₃, em posição *orto* ou *meta* ou *para* dos anéis aromáticos de Ar;

W1 é pelo menos um dentre H, F, Cl, Br, OCH₃, OH, OCF₃, CH₃, C₂H₅, CH(CH₃)₂, CF₃, CN, NO₂, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, NHCH(CH₃)₂, NHC(CH₃)₃, N(C₂H₅)₂, CO₂CH₃, CO₂Et, CO₂H, SO₃H, SO₂NH₂, SO₂NHCH₃, NH₂SO₂CH₃, SO₂CH₃, CONH₂, CONHCH₃, COCH₂SO₂CH₃, Ph, benzila ou toluidina, em posição *orto* ou *meta* ou *para* dos anéis aromáticos de Ar;

R é pelo menos um dentre H, alquila alifática (linear ou ramificada) contendo até 10 átomos de carbono, benzila, fenila, cicloalquila (C₃-C₆), CH₂-cicloalquila (C₃-C₆); e

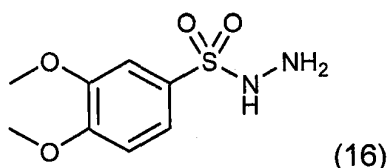
b) um veículo farmacêuticamente aceitável.

A composição farmacêutica descrita acima é útil como hipoglicemiante, e apresenta capacidade de modular a via do PPAR-γ e/ou ativar estes receptores, conferindo proteção para DM2 e DM1. Além disso, ela apresenta utilidade no tratamento de complicações crônicas do diabetes, como neuropatia, retinopatia, cardiopatia e renopatia. Ela ainda é capaz de atuar na via da adiponectina, estimulando-a.

A composição acima também apresenta propriedades anti-inflamatórias e, modula a produção de citocinas inflamatórias (e.g. TNFα e IL-1β).

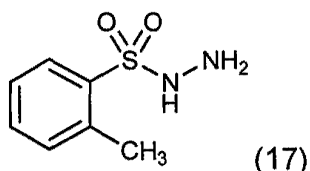
Exemplo 1 – Síntese

i) 3,4-dimetoxibenzenossulfonil hidrazida



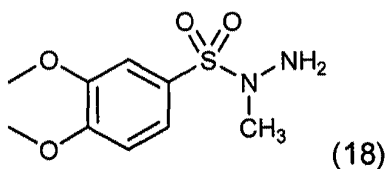
Preparado de acordo com o **Método Geral A** utilizando o cloreto de 3,4-dimetoxibenzenossulfonila (1g; 4,27mmol), hidrato de hidrazina 80% (20 equiv.; 3,3mL) e 20mL de clorofórmio. Após isolamento, foram obtidos 0,686g de 3,4-dimetoxibenzenossulfonil hidrazida (68% de rendimento) como um sólido branco.

ii) 2-metilbenzenossulfonil hidrazida



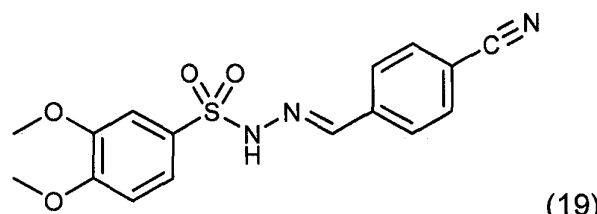
Preparado de acordo com o **Método Geral A** utilizando o cloreto de 2-metilbenzenossulfonila (1g; 5,24mmol), hidrato de hidrazina 80% (20 equiv.; 5,8mL) e 20mL de clorofórmio. Após isolamento, foram obtidos 0,830g de 2-metilbenzenossulfonil hidrazida (87% de rendimento) como um óleo castanho.

iii) 3,4-dimetoxi-N-metilbenzenosulfonohidrazida



Preparado de acordo com o **Método Geral D** utilizando a hidrazida (16) (0,5g; 2,16mmol), anidrido ftálico (1,35 equiv.; 0,43g; 2,92mmol), K₂CO₃ (2,5 equiv.; 0,768g; 5,56mmol), CH₃I (3,8 equiv.; 0,521mL; 8,34mmol), 5mL de DMF e NH₂NH₂ 80% (0,06mL; 2,43mmol). Após purificação em coluna cromatográfica de sílica, utilizando uma mistura de acetato de etila:hexano 30:70, foram obtidos 0,397g de (18) (75% de rendimento) como um óleo castanho claro.

iv) (E)-N'-(4-cianobenzilidieno)-3,4-dimetoxibenzenossulfonilidrazona (LASSBio-1771)



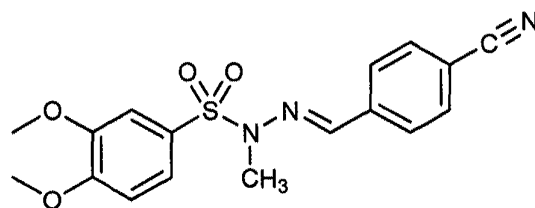
(19)

Preparado de acordo com o **Método Geral B** utilizando a 3,4-dimetóxi benzenosulfonil hidrazida (0,87mmol; 0,2g), 4-cianobenzaldeído (0,91mmol; 0,12g) em 10mL de etanol. Após a filtração à vácuo o LASSBio-1771 (19) foi obtido como um sólido amarelado com 77% de rendimento (0,236g).

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ (ppm) 11.68 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.84 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.73 (d, J = 8.4Hz, 2H), 7.46 (dd, J = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.79 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO) δ (ppm) 152.49, 148.54, 144.72, 138.04, 132.68, 130.23, 127.22, 121.06, 118.52, 111.52, 111.89, 111.27, 109.72, 55.80, 55.77.

v) (E)-N'-(4-cianobenzildieno)-3,4-dimetoxi-N-metilbenzenosulfonil hidrazona (LASSBio-1772)



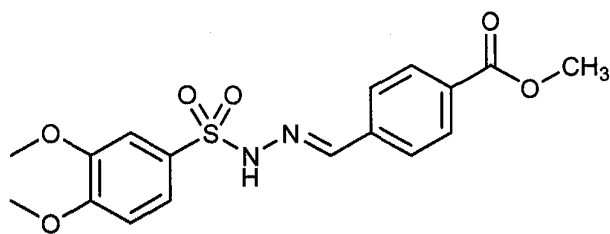
(20)

Preparado de acordo com o **Método Geral C** utilizando o LASSBio-1771 (0,57mmol; 0,2g), K_2CO_3 (1,54mmol; 0,21g) e CH_3I (0,95mmol; 0,059mL) em 10mL de acetona. Após a filtração à vácuo o LASSBio-1772 (20) foi obtido como um sólido amarelado com 91% de rendimento (0,187g).

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ (ppm) 7.89 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.83 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.45 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.15 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.21 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO) δ (ppm) 152.96, 148.59, 141.48, 138.64, 132.76, 127.32, 127.05, 121.65, 118.61, 111.69, 111.34, 110.12, 55.85, 55.81, 33.46.

vi) **(E)-metil-4-((2-(3,4-dimetoxifenilsulfonil)hidrazono)metil)benzoato (LASSbio-1773)**



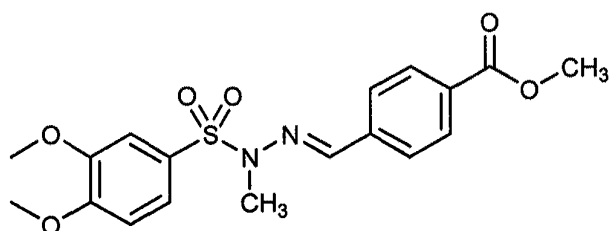
(21)

Preparado de acordo com o **Método Geral B** utilizando a 3,4-dimetóxi-benzenossulfonil hidrazida (4,23mmol; 1g), 4-formilbenzoato de metila (4,42mmol; 0,726g) em 30mL de etanol. Após a filtração à vácuo o LASSBio-1773 (21) foi obtido como um sólido branco com 99% de rendimento (1,735g).

¹H NMR (200 MHz, DMSO) δ (ppm) 11.61 (s, 1H), 7.96 (d, J = 7.3 Hz, 3H), 7.71 (d, J = 8.4Hz, 2H), 7.48 (dd, J = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.14 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.81 (s, 6H).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO) δ (ppm) 165.68, 152.41, 148.50, 145.37, 137.98, 130.37, 130.29, 129.53, 126.78, 120.96, 111.22, 109.73, 55.75, 55.72, 52.15.

vii) **(E)-metil-4-((2-(3,4-dimetoxifenilsulfonil)-2-metil)hidrazono)metilbenzoato (LASSBio-1774)**

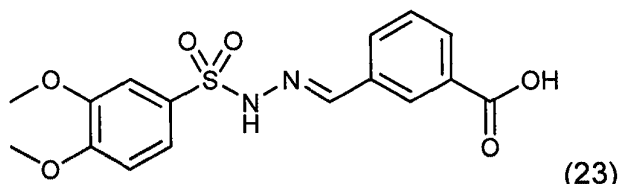


(22)

Preparado de acordo com o **Método Geral C** utilizando o LASSBio-1773 (21) (0,6mmol; 0,2g), K₂CO₃ (1,6mmol; 0,23g) e CH₃I (1mmol; 0,06mL) em 10mL de acetona. Após a filtração à vácuo o LASSBio-1774 (22) foi obtido como um sólido branco com 75% de rendimento (0,152g).

¹H NMR (400 MHz, dmso) δ (ppm) 7.99 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.84 (s, 1H), 7.78 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.43 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.18 (s, 3H).

viii) **Ácido** **(E)-3-((2-(3,4-dimetoxifenilsulfonil)hidrazono)metil)benzoico (LASSBio-1775)**

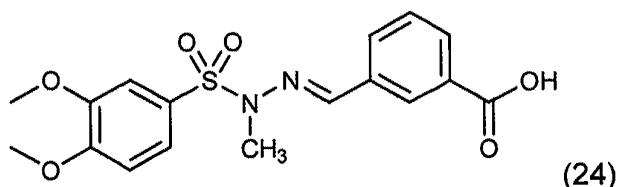


Preparado de acordo com o **Método Geral B** utilizando 3,4-dimetoxibenzenossulfonil hidrazida (1 equiv.; 0,5g; 2,16mmol), 3-carboxibenzaldeído (1,1 equiv.; 0,337g; 2.25mmol) e 5mL de etanol. Após filtração à vácuo, foram obtidos 0,8g de LASSBio-1775 (23) (99% de rendimento) como um sólido branco.

¹H NMR (500 MHz, dmso) δ (ppm) 11.98 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.92 (t, J = 8.6 Hz, 3H), 7.62 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.56 – 7.50 (m, 1H), 7.40 (dd, J = 13.9, 7.5 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 2.62 (s, 3H).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO) δ (ppm) 165.65, 144.51, 137.96, 137.35, 137.02, 133.09, 132.46, 130.31, 129.50, 129.24, 126.70, 126.37, 52.10, 19.98.

ix) **Ácido** **(E)-3-((2-(3,4-dimetoxifenilsulfonil)-2 metil hidrazono) metil)benzóico (LASSBio-1853)**

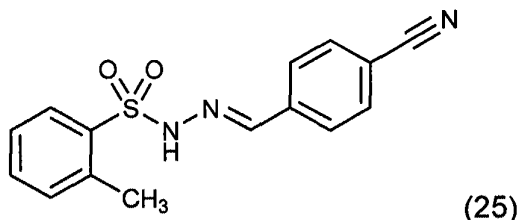


Preparado de acordo com o **Método Geral C** utilizando o LASSBio-1775 (23) (0,66mmol; 0,25g), K₂CO₃ (1,76mmol; 0,24g) e CH₃I (1,1mmol; 0,075mL) em 10mL de acetona. Após a filtração à vácuo o LASSBio-1853 (24) foi obtido como um sólido branco com 62% de rendimento (0,165g).

¹H NMR (200 MHz, DMSO) δ (ppm) 8.26 (s, 1H), 8.00 – 7.87 (m, 3H), 7.58 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.14 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.19 (s, 3H).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO) δ (ppm) 165.77, 152.85, 148.51, 142.82, 134.85, 131.39, 130.16, 129.35, 127.09, 126.96, 121.49, 111.25, 110.21, 55.82, 55.61, 52.27, 33.54.

x) **(E)-N'-(4-cianobenzildieno)-2-metilbenzeno sulfononilidrazida (LASSBio-1855)**

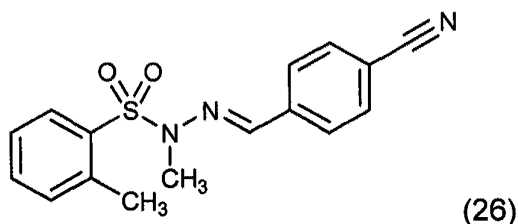


Preparado de acordo com o **Método Geral B** utilizando a 2-metilbenzenossulfonil hidrazida (2,71mmol; 0,5g), 4-cianobenzaldeído (2,9mmol; 0,38g) em 10mL de etanol. Após a recristalização em uma mistura de hexano e acetato de etila, o LASSBio-1855 (**25**) foi obtido como um sólido amarelado com 81% de rendimento (1,3g).

¹H NMR (200 MHz, DMSO) δ (ppm) 12.11 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.93 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.55 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 7.42 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.63 (s, 3H).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO) δ (ppm) 143.84, 138.04, 137.07, 133.22, 132.67, 132.53, 129.35, 127.14, 126.46, 118.51, 111.80, 20.03.

xi) **(E)-N'-(4-cianobenzildieno)-N,2-dimetil benzeno sulfononilirazida (LASSBio-1854)**

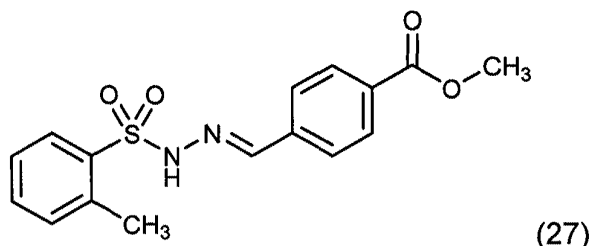


Preparado de acordo com o **Método Geral C** utilizando o LASSBio-1855 (**25**) (2,68mmol; 0,8g), K₂CO₃ (7,14mmol; 0,98g) e CH₃I (4,46mmol; 0,274mL) em 50mL de acetona. Após a recristalização em uma mistura de hexano e acetato de etila, o LASSBio-1854 (**26**) foi obtido como um sólido amarelado com 71% de rendimento (0,6g).

¹H NMR (200 MHz, DMSO) δ 7.97 – 7.90 (m, 1H), 7.86 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 7.70 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.58 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 7.44 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.60 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO) δ 143.84, 138.04, 137.07, 133.22, 132.67, 132.53, 129.35, 127.14, 126.46, 118.51, 111.80, 20.03.

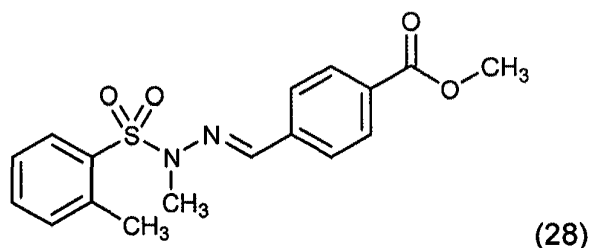
xii) (E)-metil 4-((2-(o-toluisulfonil)hidrazono)metil)benzoato (LASSBio-1776)



Preparado de acordo com o **Método Geral B** utilizando a 2-metilbenzenossulfonil hidrazida (2,71mmol; 0,5g), 4-formilbenzoato de metila (2,9mmol; 0,47g) em 10mL de etanol. Após a filtração à vácuo, o LASSBio-1776 (27) foi obtido como um sólido branco com 70% de rendimento (0,67g).

^1H NMR (500 MHz, dmso) δ (ppm) 11.98 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.92 (t, J = 8.6 Hz, 3H), 7.62 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.56 – 7.50 (m, 1H), 7.40 (dd, J = 13.9, 7.5 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 2.62 (s, 3H).

xiii) (E)-metil 4-((2-metil-2-(o-toluisulfonil)hidrazono)metil)benzoato (LASSBio-1777)

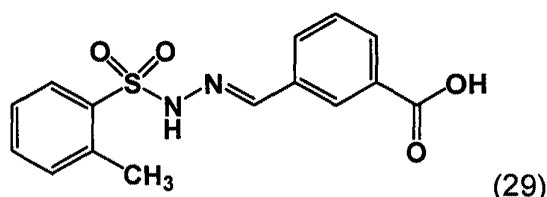


Preparado de acordo com o **Método Geral C** utilizando o LASSBio-1776 (27) (0,57mmol; 0,2g), K_2CO_3 (1,54mmol; 0,21g) e CH_3I (0,95mmol; 0,06mL) em 10mL de acetona. Após a filtração à vácuo, o LASSBio-1777 (28) foi obtido como um sólido branco com 67% de rendimento (0,14g).

^1H NMR (200 MHz, DMSO) δ (ppm) 7.99 (s, 1H), 7.92 (d, J = 12.5 Hz, 3H), 7.68 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.63 – 7.51 (m, 1H), 7.44 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 2.61 (s, 3H).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO) δ (ppm) 165.76, 140.91, 138.59, 137.62, 135.50, 133.57, 132.80, 130.11, 129.89, 129.60, 126.85, 126.56, 52.17, 32.48, 20.21.

5 **xiv) Ácido (E)-metil 4-((2-(o-toluisulfonil)hidrazono)metil)benzoico (LASSBio-1778)**



Preparado de acordo com o **Método Geral B** utilizando a 2-metilbenzenossulfonil hidrazida (2,71mmol; 0,5g), 3-carboxibenzaldeído (2,71mmol; 0,38g) em 10mL de etanol. Após a recristalização em uma mistura de hexano e acetato de etila, o LASSBio-1778 (29) foi obtido como um sólido branco com 72% de rendimento (0,6g).

¹H NMR (200 MHz, DMSO) δ (ppm) 11.89 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.92 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.73 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.60 – 7.48 (m, 2H), 7.43 (dd, J = 12.0, 4.7 Hz, 2H), 2.65 (s, 3H).

15 ¹³C NMR (50 MHz, DMSO) δ (ppm) 166.76, 145.11, 137.50, 137.10, 134.13, 133.11, 132.52, 131.33, 130.84, 130.46, 129.26, 129.15, 127.13, 126.43, 20.07.

Exemplo 2 – Ensaios *in silico* e *in vitro*

20 Estudos de docking molecular com a proteína alvo, permitiram determinar a afinidade teórica destes compostos por PPAR-γ, destacando-se o LASSBio-331, previamente descrito como protótipo analgésico e anti-inflamatório. Estes resultados indicaram LASSBio-331 como um promissor protótipo para o tratamento do DM, haja vista, sua significativa afinidade teórica pelos receptores PPAR-γ (delta G de ligação) e seu efeito anti-inflamatório. A partir dessa premissa uma nova serie de sulfonilidrazonas originais foi planejada com base em LASSBio-331, aplicando-se as estratégias de bioisosterismo não-clássico de grupos funcionais e regioisomerismo.

Os novos compostos desenhados foram submetidos a screening virtual com a proteína alvo (i.e PPAR- γ), revelando a geometria e interações favoráveis com o biorreceptor. A partir destes estudos os compostos foram sintetizados e a afinidade por PPAR- γ medida experimentalmente. Conforme

5 ilustrado na tabela 3, LASSBio-331 não apresentou afinidade compatível com o biorreceptor em questão, enquanto LASSBio-1470, LASSBio-1471 e LASSBio-1503 apresentaram baixa afinidade.

Tabela 3

	K_i (μ M)	CI_{50} (μ M)
rosiglitazona (60)	0,0075	0,014
LASSBio-1503 (E) (76)	29	54
LASSBio-1470 (E) (74)	34	65
LASSBio-1471 (E) (75)	48	90
LASSBio-1523 (E) (77)	>100	>100
LASSBio-331 (E) (63)	>100	>100

10 A despeito da ausência de correlação entre os dados *in silico* e os experimentais, as novas sulfonilidrazonas e seu protótipo LASSBio-331 foram testados em modelo murino de diabetes induzido por estreptozotocina. Neste modelo LASSBio-1471 e LASSBio-1473 foram ativos em tratamento crônico, sugerindo que o efeito hipoglicemiante observado *in vivo* pode não estar

15 correlacionado à ativação direta de PPAR- γ . Os resultados podem ser vistos na figura 1. Para obtenção dos dados apresentados na figura 1, os ratos foram tratados com (STZ) 45mg/Kg i.p. para indução do DM e, posteriormente tratados com 20mg/Kg de LASSBio 1471 e LASSBio 1473 em doses diárias (* indica $p < 0,05$).

20

Exemplo 3 - Avaliação do perfil hipoglicemiante dos compostos obtidos

Com o objetivo de avaliar o potencial hipoglicemiante dos compostos sintetizados, foi realizada a média da glicemia em ratos com Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina. O estabelecimento do DM pode ser observado

após uma semana pelo aumento significativo da glicemia, a qual se mantém aumentada durante as semanas subsequentes (Figura 2). Os ratos controle, injetados apenas com o veículo (Tampão citrato pH 5,0), não apresentaram alteração no perfil glicêmico. Os ratos foram tratados com STZ 60 mg/kg em dose única i.v. e a glicemia medida ao longo de 6 semanas. Os dados foram expressos como Média \pm EPM (* indica $< 0,01$ vs controle; $n=5$ para cada ensaio).

Após 14 dias, os animais diabéticos foram tratados com LASSBio-1771, LASSBio-1772, LASSBio-1773, LASSBio-1774, LASSBio-1775, LASSBio-1776, LASSBio-1853 55 $\mu\text{mol/kg}$ ou DMSO 0,5% (veículo) em dose única intraperitoneal (Figura 3). Os ratos diabéticos foram tratados com LASSBio-1771, LASSBio-1772, LASSBio-1773 e LASSBio-1774 em dose única i.p. de 55 $\mu\text{mol/kg}$ e a glicemia foi avaliada nos tempos indicados. Os dados foram expressos como Média \pm EPM (* indica $p < 0,01$ vs DMSO).

O efeito agudo sobre os níveis glicêmicos dos ratos diabéticos foi avaliado em tempos que variaram de 15 a 180 minutos. Nessas condições, LASSBio-1773 promoveu redução significativa na glicemia dos ratos diabéticos, após 120 minutos, a qual retornou para o nível do controle após 180 minutos. Na presença de LASSBio-1774 foi observada redução significativa de após 180 minutos. Entretanto os demais compostos testados e o veículo, DMSO 0,5%, não apresentaram efeito sobre a glicemia dos animais diabéticos no modelo estudado.

Tendo em vista que LASSBio-1471 e LASSBio-1473, protótipos utilizados para o desenvolvimento das novas séries, apresentaram efeito hipoglicemiante em modelo de Diabetes Melitus após tratamento crônico, realizamos o ensaio com essas moléculas em modelo agudo afim de comparar os efeitos obtidos para LASSBio-1773 e LASSBio-1774.

A Figura 4 mostra que LASSBio-1471 e LASSBio-1473 não apresentam efeito hipoglicemiante após tratamento agudo, diferente do observado para os compostos LASSBio-1773 e LASSBio-1774, mostrando importante vantagem da nova série em detrimento dos protótipos originais.

Considerando que o modelo de indução de DM por STZ é bem caracterizado pela perda da capacidade do pâncreas em sintetizar insulina e que os compostos foram desenvolvidos com objetivo de aplicação em DM2, avaliou-se o efeito de LASSBio-1773 e LASSBio-1774 em modelo de hiperglicemia induzida em peixe-zebra. Nesse modelo a hiperglicemia é induzida pela injeção intraperitoneal de glicose 25% nos animais em jejum e a glicemia medida 3, 12 e 24 horas após a injeção.

Os resultados apresentados na Figura 5 mostram que a glicemia dos animais em jejum foi de 56,2 mg/dL, aumentou para 411,5 mg/dL 3 horas após a injeção da solução de glicose. O valor obtido após 12 horas foi de 254,4 mg/dL e de 192,5 mg/dL em 24 horas, mostrando que os animais se mantêm hiperglicêmicos 24 horas após a injeção de glicose 25%. Dessa forma, para avaliar se esses altos valores de glicemia poderiam ser revertidos, foram administrados três fármacos presentes no mercado com comprovada eficácia terapêutica no tocante da redução dos níveis glicêmicos. Para obtenção dos resultados, os animais adultos em jejum foram submetidos ao tratamento com glicose 25% por via i.p. e a glicemia foi medida após os tempos indicados (os dados foram expressos como média \pm EPM; * indica $P < 0,05$; ** indica $P < 0,01$ ANOVA "one-way" seguido de Mann-Whitney; $n=10$).

Inicialmente, insulina1U/animal NPH foi co-administrada com solução de glicose 25%, e os valores de glicemia encontrados em 3, 12 e 24 horas são mostrados na Figura 6. Como pode ser observado, em 3 horas após a injeção de insulina existe um aumento dos níveis de glicose para 567,5 mg/dL, glicemia essa que foi reduzida para 36,5 mg/dL em 12 horas de tratamento e para 18 mg/dL em 24 horas (os dados foram expressos como Média \pm EPM; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ ANOVA "one way" seguido de Mann-Whitney; $n=10$).

A co-administração de 100 μ mol/Kg de glibenclamida, uma sulfoniluréia com ação secretagoga, e glicose 25% promoveu aumento da glicemia dos animais quando comparada ao controle de glicose em 3 horas, tendo sido a média dos valores encontrados de 597 mg/dL. Esse valor foi reduzido no decorrer do tratamento para 395 mg/dL em 12 horas e 96,5 mg/dL em 24 horas

(Figura 7) (os dados foram expressos como Média \pm EPM; *P< 0,05; **P< 0,01 ANOVA “one way” seguido de Mann-Whitney; n=10)

O mesmo perfil em 3 horas foi encontrado no tratamento desses animais com pioglitazona na dose de 157 μ mol/Kg, com média de 578 mg/dL. Em 12
5 horas a média encontrada foi de 156,1 mg/dL e em 24 horas foi de 152,1 mg/dL, como mostrado na Figura 8. Os resultados obtidos indicam que o modelo de hiperglicemia utilizado é responsivo aos fármacos utilizados no tratamento do DM, validando sua utilização para os ensaios posteriores. Para obtenção dos resultados apresentados na figura 8, a pioglitazona foi co-
10 administrada por via i.p. com glicose 25% na dose de 157 μ mol/kg e a glicemia foi medida após os tempos indicados (os dados foram expressos como Média \pm EPM; *P< 0,05; **P< 0,01 ANOVA “one way” seguido de Mann-Whitney; n=10)

Conforme mencionado anteriormente, os compostos LASSBio-1773 e LASSBio-1774 apresentaram efeito hipoglicemiante quando avaliados em
15 modelo agudo de Diabetes Melitus induzida por estreptozotocina em ratos. Desse modo, os mesmos compostos foram selecionados para avaliação quanto à capacidade de redução dos níveis glicêmicos no modelo de hiperglicemia em peixe-zebra.

Dessa forma, LASSBio-1773 na dose de 100 μ mol foi coadministrado
20 com a solução de glicose e os níveis glicêmicos avaliados em 3, 12 e 24 horas de tratamento. Podemos observar que, da mesma forma que ocorre com todos os outros compostos, LASSBio-1773 também promove aumento dos valores de glicemia no tempo de 3 horas de tratamento, com uma glicemia de 598 mg/dL. Esses valores se mantiveram altos 12 horas pós-tratamento, chegando a 483,6
25 mg/dL e foram revertidos em 24 horas, com os níveis de glicose em 78,6 mg/dL (Figura 9) (os dados foram expressos como Média \pm EPM; *P< 0,05; **P< 0,01 ANOVA “one way” seguido de Mann-Whitney; n=10).

Aplicando-se a mesma abordagem metodológica, LASSBio-1774 a 100 μ mol/Kg foi administrado e a glicemia encontrada nos tempos avaliados são
30 mostradas na Figura 10 (os dados foram expressos como Média \pm EPM; *P< 0,05; **P< 0,01 ANOVA “one way” seguido de Mann-Whitney; n=10). De forma

semelhante aos outros compostos, LASSBio-1774 também promoveu aumento da glicemia no tempo de 3 horas, chegando a 557,7 mg/dL, sendo este nível glicêmico reduzido em 12 horas, passando a 134,5 mg/dL e chegando ao valor de 113,5 mg/dL em 24 horas pós-tratamento.

- 5 Ao compararmos os valores de glicemia encontrados nos animais em jejum e tratados com os fármacos ou protótipos verificamos que o tratamento com LASSBio-1773 ou LASSBio-1774 100 $\mu\text{mol/Kg}$ reduziu em mais de 5 vezes o valor de glicemia (Tabela 4). O percentual de redução observado para os compostos foi de 86,8% e 81,5%, respectivamente (Figura 11). A magnitude
- 10 de efeito hipoglicemiantes dos protótipos testados foi semelhante em ambos os modelos utilizados para avaliação. Para obtenção dos resultados apresentados na figura 11, as substâncias foram co-administradas por via i.p com glicose 25% nas seguintes doses: Pioglitazona 157 $\mu\text{mol/kg}$, glibenclamida, LASSbio-1773 e LASSbio-1774 100 $\mu\text{mol/kg}$. O percentual médio de redução foi
- 15 calculado utilizando a glicemia medida após 24 horas em relação ao tempo de 3 horas após o tratamento.

Tabela 4

TRATAMENTO	Redução após 24 Horas
GLICOSE + INSULINA 1 U/animal	30,9
GLICOSE + PIOGLITAZONA 157 $\mu\text{mol/kg}$	3,7
GLICOSE + GLIBENCLAMIDA 100 $\mu\text{mol/kg}$	6,2
GLICOSE + LASSBio-1773 100 $\mu\text{mol/kg}$	7,6
GLICOSE + LASSBio-1774 100 $\mu\text{mol/kg}$	5,4

- A análise do perfil temporal de ação dos protótipos LASSBio-1773 e
- 20 LASSBio-1774 em modelo de hiperglicemia em peixe-zebra (Figura 12), apontou para perfis de redução da glicemia muito semelhantes ao dos fármacos glibenclamida e pioglitazona, respectivamente.

Como pode se observar, LASSBio-1773 possui um perfil de diminuição curso temporal semelhante a glibenclamida, ou seja, uma discreta redução dos níveis glicêmicos em 12 horas com uma acentuada redução em 24 horas. Além disso, LASSBio-1774 assemelha-se com pioglitazona no mesmo experimento, tendo uma diminuição drástica da glicemia em 12 horas e manutenção ou apenas uma discreta redução desses valores em 24 horas.

Esses dados indicam LASSBio-1773 e LASSBio-1774 poderiam possuir mecanismos de ação diferentes, visto que seus correlatos nos gráficos igualmente os possuem, conforme pode ser visto, respectivamente, nas figuras 12 e 13. Para a obtenção dos resultados apresentados na figura 12 e 13, as substâncias foram co-administradas por via i.p. com glicose 25% nas concentrações indicadas (os dados foram expressos como Média \pm EPM; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ ANOVA "one way" seguido de Mann-Whitney; $n=10$).

Exemplo 4 - Avaliação do perfil anti-inflamatório do LASSBio-1773 e LASSBio-1774

Tendo em vista o interesse no desenvolvimento de moléculas com efeito "dual hipoglicemiante" e antiinflamatório, o próximo passo desse trabalho foi a avaliação do efeito antiinflamatório de LASSBio-1773 e LASSBio-1774, os quais apresentaram efeito hipoglicemiante no ensaio com ratos diabéticos. De acordo com os resultados apresentados na Figura 14, apenas LASSBio-1774 (30 $\mu\text{mol/kg}$) reduziu o infiltrado de células inflamatórias no modelo de peritonite induzida por carragenina (6 animais), de modo similar à indometacina e LASSBio-1474 (30 $\mu\text{mol/kg}$), administrados por via oral, enquanto LASSBio-1773 só foi ativo na dose de 30 $\mu\text{mol/kg}$ (dados não mostrados). Nos resultados apresentados na figura 14, as colunas representam a média e as barras representam o erro padrão da média (** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ no teste de ANOVA "One Way" seguido do teste de Dunnet).

Investigação do mecanismo de ação dos compostos sintetizados

Conforme detalhado inicialmente, as séries de compostos inéditos desenvolvidas nesse trabalho foram planejadas utilizando diferentes estratégias da química medicinal utilizando como protótipos moléculas delineadas anteriormente, cujo padrão estrutural continha os requisitos
5 moleculares mínimos de ligantes PPAR γ , de acordo com o descrito por Mahindroo e colaboradores (2005). Entretanto, no desenho destes novos derivados o principal farmacóforo para reconhecimento pelos receptores PPAR γ foi retirado (i.e. grupos com natureza ácida), visando assegurar mecanismo de ação diferente da atividade agonista PPAR γ .

10 Considerando que a modulação de vias do PPAR γ , mas não a ação direta sobre os receptores, poderia constituir alvo molecular promissor para novos fármacos anti-diabetes e sabendo da correlação destas vias com os níveis de expressão de adipocinas pelo tecido adiposo, avaliamos a capacidade dos compostos sintetizados modularem a expressão do mRNA de
15 adiponectina e leptina em larvas de peixe-zebra. Para tanto, conforme pode ser visto na figura 15, foram coletadas larvas de peixe-zebra com 96 hpf as quais foram incubadas com glicose 40 μ M e pioglitazona 1 μ M, glibenclamida 250 μ M, LASSBio-1773 10 μ M ou LASSBio-1774 10 μ M, por 24 horas. Foi realizado RT-PCR convencional e os níveis de expressão foram calculados pela razão
20 Adiponectina/actina após análise densitométrica (os dados foram expressos como Média \pm EPM da razão; n=2. Seu mRNA total foi extraído e uma biblioteca de cDNA montada, de onde as amostras para reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa foram retiradas.

A Figura 15 mostra que LASSBio-1773 e LASSBio-1774 aumenta os
25 níveis de mRNA de adiponectina A, do mesmo modo que a pioglitazona. Entretanto o efeito sobre adiponectina B é reduzido. A glibenclamida não apresentou efeito sobre a expressão de de adiponectina A e B, sugerindo que os compostos testados exerçam mecanismo distinto desta sulfonilureia utilizada clinicamente como fármaco anti-diabetes.

30 A medida de expressão de leptina por LASSBio-1773 e LASSBio-1774 evidenciou uma diminuição dos níveis de mRNA dos animais tratados com

LASSBio-1773 e LASSBio-1774 com ambos os compostos. Entretanto glibenclamida e pioglitazona não foram capazes de modular a expressão desse hormônio (Figura 16). Quando indicado, as larvas de peixe-zebra com 96hpf foram incubadas com glicose 40μM por 24 horas. Foi realizado RT-PCR convencional e os níveis de expressão foram calculados pela razão leptina/actina após análise densitométrica (os dados foram expressos como média ± EPM da razão; n=2).

Efeito sobre as complicações tardias do DM

Conforme mencionado anteriormente, o caráter crônico do DM propicia o surgimento de complicações tardias associadas à manutenção de altos níveis de glicose plasmática, bem como de um processo inflamatório subjacente. Um dos principais danos observados é a neuropatia diabética periférica, a qual pode ser avaliada em murinos por ensaios de hiperalgesia térmica e alodinia mecânica.

A figura 17A e 17B mostram a instauração do quadro de neuropatia periférica diabética. Os ratos foram tratados com STZ 60 mg/kg em dose única i.v. e submetidos aos testes de hiperalgesia térmica (A) e alodinia mecânica (B). Os dados foram expressos como Média ± EPM (* P < 0,01 vs antes da STZ; # P < 0,01 vs controle; n=5 para cada ensaio).

Inicialmente observou-se o curso de estabelecimento da neuropatia diabética nos ratos tratados com estreptozotocina. A Figura 18A e 18B mostram que o aumento das sensibilidades térmica e mecânica se estabelece, respectivamente, a partir da terceira e da quarta semana após a injeção de estreptozotocina em dose intravenosa única de 60 μm/kg. Os ratos diabéticos foram tratados com LASSBio-1773 ou LASSBio-1774 na dose de 55μmol/kg em (A) e DMSO 0,5% ou glibenclamida 0,2 mg/kg i.p. em (B) em dose única i.p. e submetidos ao teste de hiperalgesia térmica. Os dados foram expressos como Média ± EPM (A: * P < 0,001 vs min 0; B: # P < 0,05 vs diabético + DMSO; n=5 para cada ensaio).

Após o período de 4 semanas, os compostos LASSBio-1773 e LASSBio-1774 foram administrados em dose única de 55 $\mu\text{mol/kg}$ e o efeito agudo sobre a hiperalgesia térmica e a alodinia mecânica foram avaliados em tempos que variaram de 30 a 180 minutos.

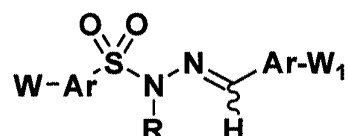
5 A administração de LASSBio-1773 e LASSBio-1774 promoveram uma redução da hiperalgesia térmica, representada pelo aumento no tempo de latência para retirada da pata, sendo esse efeito significativo em todos os tempos analisados (Figura 19A). A resposta observada para os compostos testados foi maior que a obtida na presença de glibenclamida, substância
10 hipoglicemiante amplamente utilizada no tratamento do DM. Além disso, a glibenclamida se mostrou efetiva apenas no tempo de 30 minutos (Figura 19B).

Nos ensaios de alodinia mecânica foram observados resultados semelhantes. Os compostos LASSBio-1773 e LASSBio-1774 mostraram-se efetivos, promovendo aumento significativo no limiar de retirada da pata em
15 todos os tempos avaliados (Figura 19A). Ao passo que glibenclamida, apesar de promover aumento no limiar de retirada da pata, apresentou menor magnitude de efeito e mostrou-se efetiva somente até 120 minutos (Figura 19B). A administração de DMSO 0,5%, utilizado como veículo para as substâncias administradas não alterou o perfil de sensibilidade em ambos os
20 ensaios (Figuras 19A e 19B). Os ratos diabéticos foram tratados com LASSBio-1773 ou LASSBio-1774 na dose de 55 $\mu\text{mol/kg}$ em (A) e DMSO 0,5% ou glibenclamida 0,2 mg/kg i.p. em (B) em dose única i.p. e submetidos ao teste de alodinia mecânica, conforme descrito em Metodologia. Os dados foram expressos como Média \pm EPM (A: * $P < 0,0001$ vs min 0; B: # $P < 0,05$; $P < 0,01$;
25 $P < 0,001$ vs diabético + DMSO; $n=5$ para cada ensaio).

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações**COMPOSTO SULFONILIDRAZÔNICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DO
COMPOSTO SULFONILIDRAZÔNICO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS**

- 5 1. Composto sulfonilidrazônico, caracterizado por compreender a estrutura de acordo com fórmula (I):

**Fórmula I**

em que

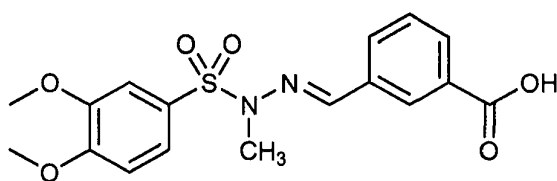
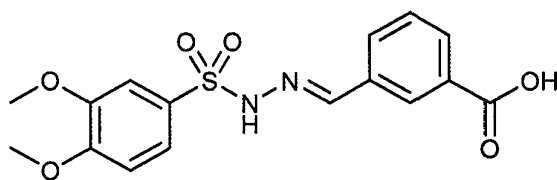
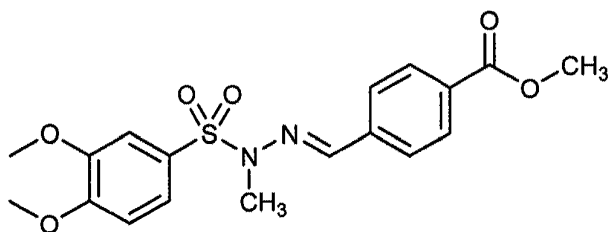
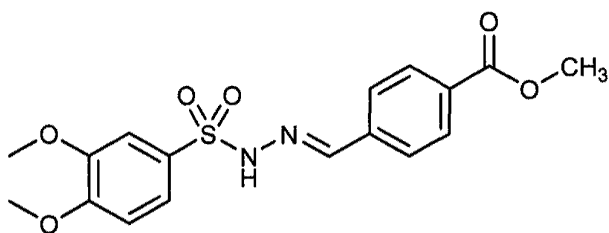
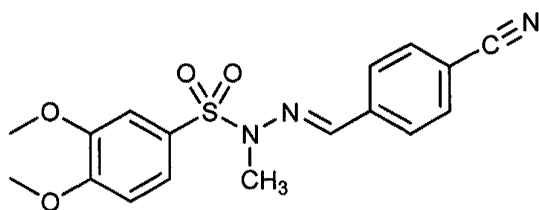
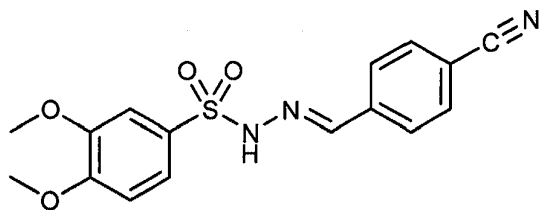
Ar é pelo menos um dentre fenila, benzila, piridina, pirimidina, piridazina,
10 quinolina, isoquinolina, quinoxalina, naftila, fenilpirazol, imadazolopiridina,
imidazola, pirazola, triazola, tetrazola, pirrola, tiofeno, furano, isozaxola,
tiadiazola ou tiazol; onde todos são opcionalmente substituídos com um ou
mais substituintes escolhidos dentre W e W1;

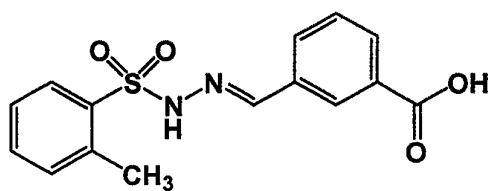
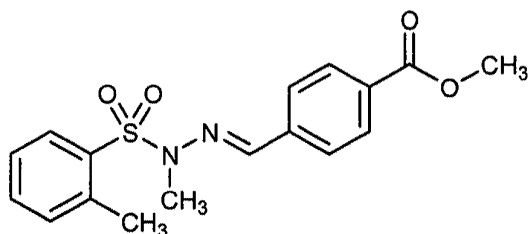
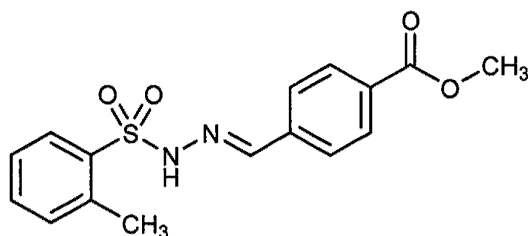
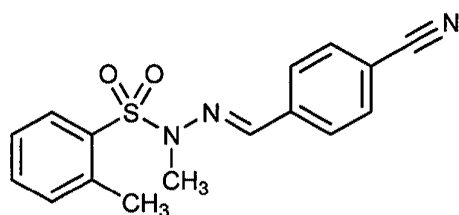
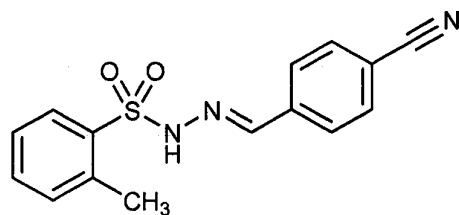
W é pelo menos um dentre H, F, Cl, Br, OCH₃, OH, OCF₃, CH₃, C₂H₅,
15 CH(CH₃)₂, CF₃, CN, NO₂, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, NHCH(CH₃)₂, NHC(CH₃)₃,
N(C₂H₅)₂, CO₂CH₃, CO₂Et, CO₂H, SO₃H, SO₂NH₂, SO₂NHCH₃, NHSO₂CH₃,
SO₂CH₃, CONH₂, CONHCH₃, ou COCH₂SO₂CH₃, em posições *orto* e/ou *meta*
e/ou *para* dos anéis aromáticos de Ar;

W1 é pelo menos um dentre H, F, Cl, Br, OCH₃, OH, OCF₃, CH₃, C₂H₅,
20 CH(CH₃)₂, CF₃, CN, NO₂, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, NHCH(CH₃)₂, NHC(CH₃)₃,
N(C₂H₅)₂, CO₂CH₃, CO₂Et, CO₂H, SO₃H, SO₂NH₂, SO₂NHCH₃, NHSO₂CH₃,
SO₂CH₃, CONH₂, CONHCH₃, COCH₂SO₂CH₃, Ph, benzila ou toluidina, em
posição *orto* ou *meta* ou *para* dos anéis aromáticos de Ar;

R é pelo menos um dentre H, alquila alifática (linear ou ramificada)
25 contendo até 10 átomos de carbono, benzila, fenila, cicloalquila (C₃-C₆), CH₂-
cicloalquila (C₃-C₆).

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser selecionado do grupo que compreende:



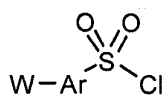


5

e combinações dos mesmos.

3. Processo de preparo de um composto sulfonilidrazônico, caracterizado por compreender as etapas de:

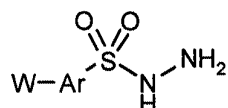
a) reação de um cloreto de sulfonila de fórmula II:



Fórmula II

com hidrazina; e

b) reação da sulfonilidrazida obtida em a) de fórmula III



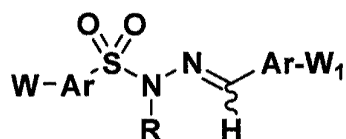
Formula III

5 com um aldeído de fórmula IV;



Fórmula IV

visando obter a sulfonilhidrazona de fórmula I



Fórmula I

10

desde que quando R for diferente de H, o processo compreende uma etapa adicional de N-alkilação que ocorre:

c.1) no composto de fórmula III obtido entre a etapa a) e a etapa b); ou

c.2) no composto de fórmula I, obtido após a etapa a);

15 em que:

Ar é pelo menos um dentre fenila, benzila, piridina, pirimidina, piridazina, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, naftila, fenilpirazol, imadazolopiridina, imidazola, pirazola, triazola, tetrazola, pirrola, tiofeno, furano, isozaxola, tiadiazola ou tiazol; onde todos são opcionalmente substituídos com um ou
20 mais substituintes escolhidos dentre W e W₁;

W é pelo menos um dentre H, F, Cl, Br, OCH₃, OH, OCF₃, CH₃, C₂H₅, CH(CH₃)₂, CF₃, CN, NO₂, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, NHCH(CH₃)₂, NHC(CH₃)₃, N(C₂H₅)₂, CO₂CH₃, CO₂Et, CO₂H, SO₃H, SO₂NH₂, SO₂NHCH₃, NH₂SO₂CH₃,

SO₂CH₃, CONH₂, CONHCH₃, ou COCH₂SO₂CH₃, em posições *orto* e/ou *meta* e/ou *para* dos anéis aromáticos de Ar;

W₁ é pelo menos um dentre H, F, Cl, Br, OCH₃, OH, OCF₃, CH₃, C₂H₅, CH(CH₃)₂, CF₃, CN, NO₂, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, NHCH(CH₃)₂, NHC(CH₃)₃,
 5 N(C₂H₅)₂, CO₂CH₃, CO₂Et, CO₂H, SO₃H, SO₂NH₂, SO₂NHCH₃, NHSO₂CH₃, SO₂CH₃, CONH₂, CONHCH₃, COCH₂SO₂CH₃, Ph, benzila ou toluidina, em posição *orto* ou *meta* ou *para* dos anéis aromáticos de Ar;

R é pelo menos um dentre H, alquila alifática (linear ou ramificada) contendo até 10 átomos de carbono, benzila, fenila, cicloalquila (C₃-C₆), CH₂-
 10 cicloalquila (C₃-C₆).

4 – Processo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por compreender as etapas de:

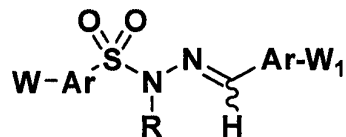
- a) reação de um cloreto de sulfonila;
- b) reação da sulfonilidrazida obtida em a) com um aldeído; e
- 15 c) N-alkilação do composto obtido em b).

5 – Processo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por compreender as etapas de:

- a) reação de um cloreto de sulfonila;
- b) N-alkilação do composto obtido em a).
- 20 c) reação da sulfonilidrazida N-alkilada obtida em b) com um aldeído;

6 – Composição farmacêutica caracterizada por compreender:

a) um composto sulfonilidrazônico de fórmula (I):



Fórmula I

em que

25 Ar é pelo menos um dentre fenila, benzila, piridina, pirimidina, piridazina, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, naftila, fenilpirazol, imadazolopiridina, imidazola, pirazola, triazola, tetrazola, pirrola, tiofeno, furano, isoxazola,

tiadiazola ou tiazol, onde todos são opcionalmente substituídos com um ou mais substituintes escolhidos dentre W e W1;

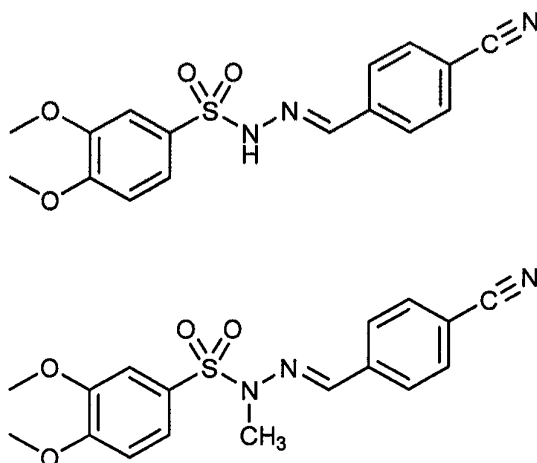
W é pelo menos um dentre H, F, Cl, Br, OCH₃, OH, OCF₃, CH₃, C₂H₅, CH(CH₃)₂, CF₃, CN, NO₂, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, NHCH(CH₃)₂, NHC(CH₃)₃,
 5 N(C₂H₅)₂, CO₂CH₃, CO₂Et, CO₂H, SO₃H, SO₂NH₂, SO₂NHCH₃, NHSO₂CH₃, SO₂CH₃, CONH₂, CONHCH₃, ou COCH₂SO₂CH₃, em posições *orto* e/ou *meta* e/ou *para* dos anéis aromáticos de Ar;

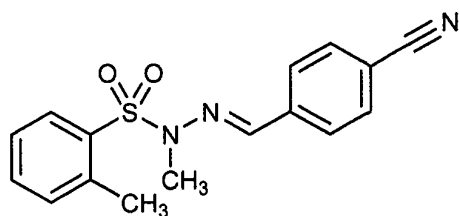
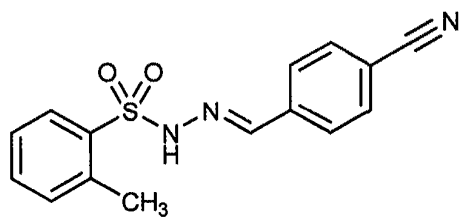
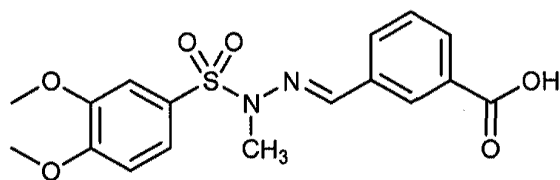
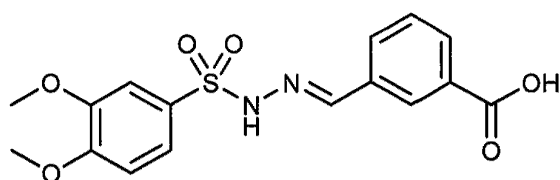
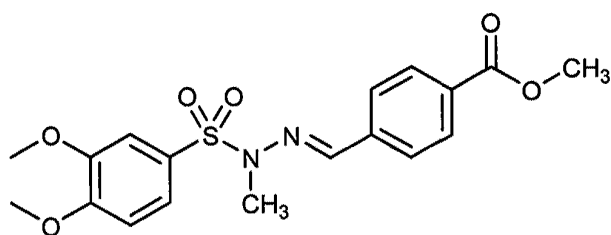
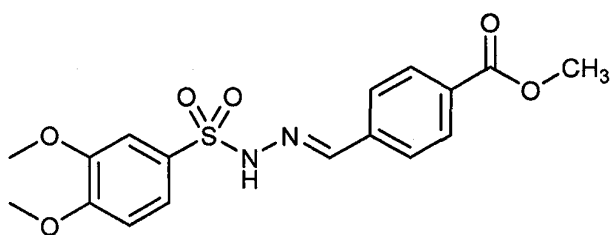
W1 é pelo menos um dentre H, F, Cl, Br, OCH₃, OH, OCF₃, CH₃, C₂H₅, CH(CH₃)₂, CF₃, CN, NO₂, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, NHCH(CH₃)₂, NHC(CH₃)₃,
 10 N(C₂H₅)₂, CO₂CH₃, CO₂Et, CO₂H, SO₃H, SO₂NH₂, SO₂NHCH₃, NHSO₂CH₃, SO₂CH₃, CONH₂, CONHCH₃, COCH₂SO₂CH₃, Ph, benzila ou toluidina, em posição *orto* ou *meta* ou *para* dos anéis aromáticos de Ar;

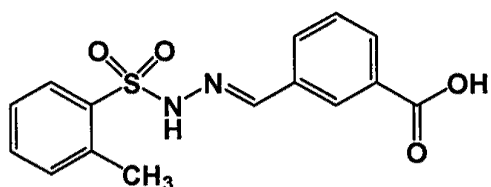
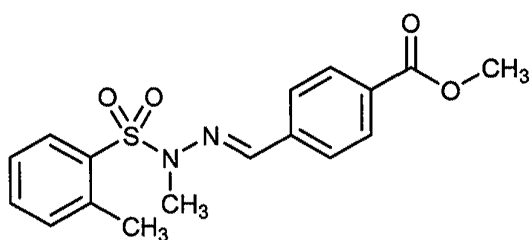
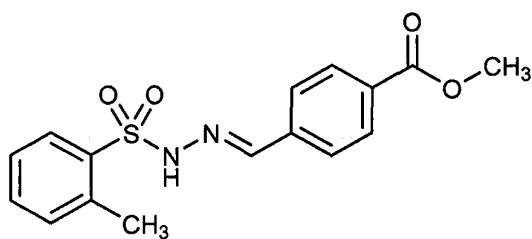
R é pelo menos um dentre H, alquila alifática (linear ou ramificada) contendo até 10 átomos de carbono, benzila, fenila, cicloalquila (C₃-C₆), CH₂-
 15 cicloalquila (C₃-C₆); e

b) um veículo farmacêuticamente aceitável.

7 – Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo composto ser selecionado do grupo que compreende:







e combinações dos mesmos.

- 5 8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por ser hipoglicemiante.
9. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por modular a atividade de receptores de PPAR-γ e/ou ativar estes receptores .
- 10 10 – Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por ser útil no tratamento de neuropatia, retinopatia, cardiopatia e/ou renopatia diabéticas e/ou proteção para DM1.
- 11 – Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por modular a via da adiponectina.
- 15 12 - Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por modular a produção de citocinas inflamatórias.

FIGURAS

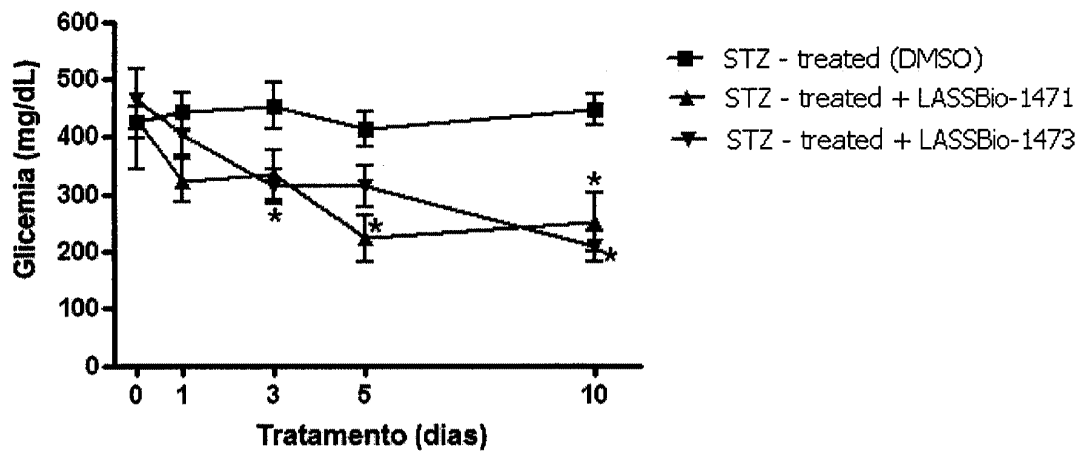


Figura 1

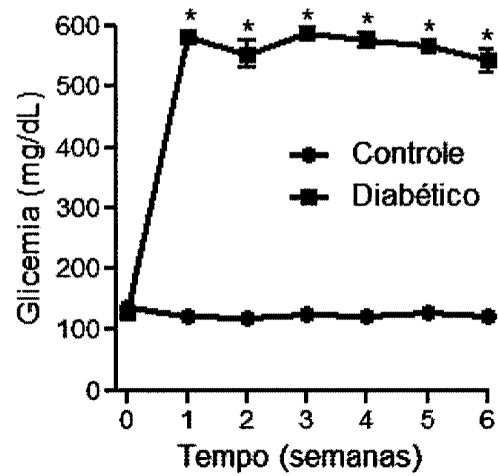


Figura 2

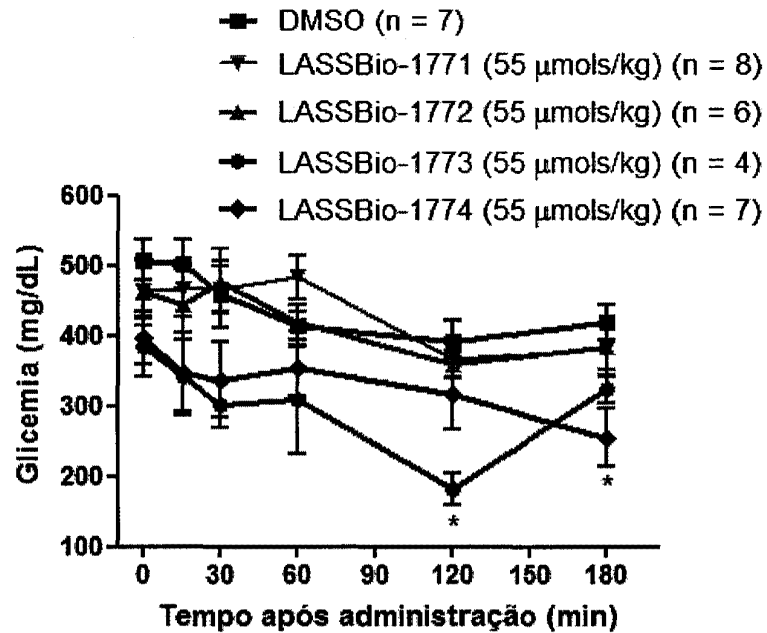


Figura 3

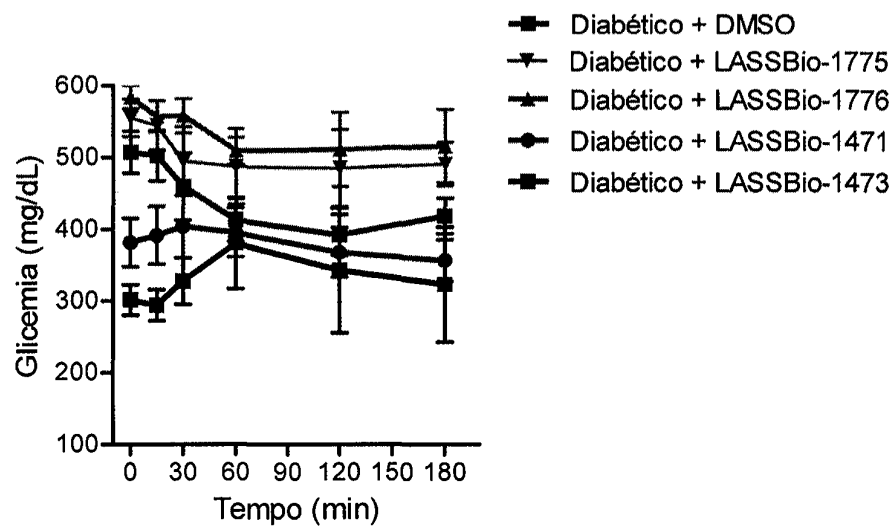


Figura 4

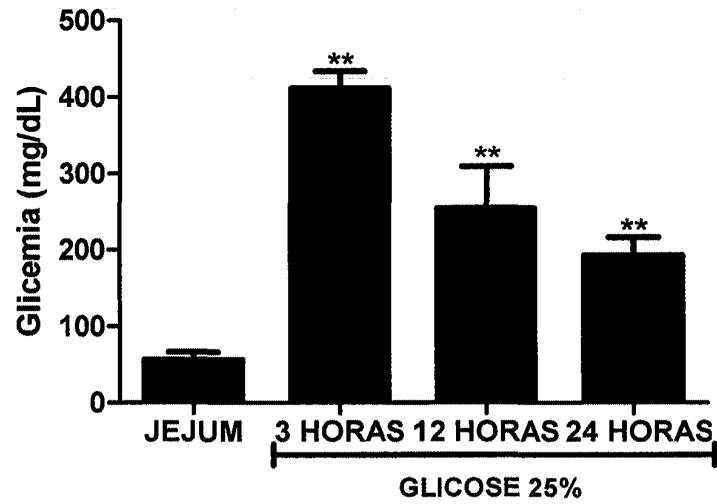


Figura 5

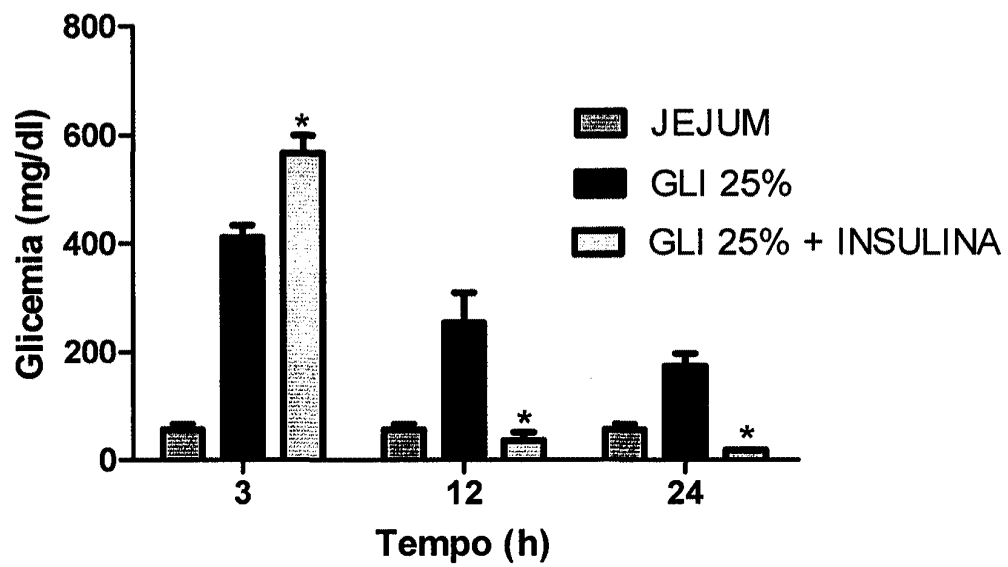


Figura 6

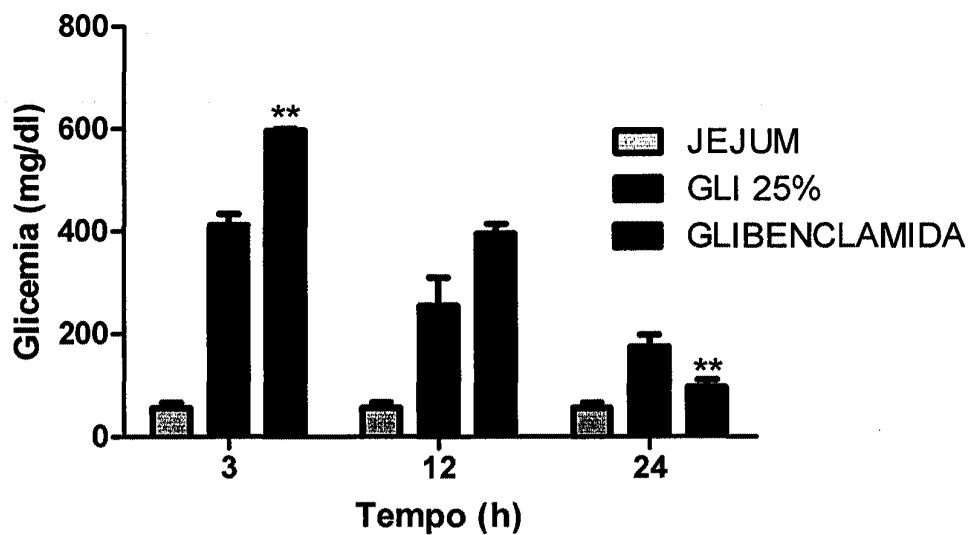


Figura 7

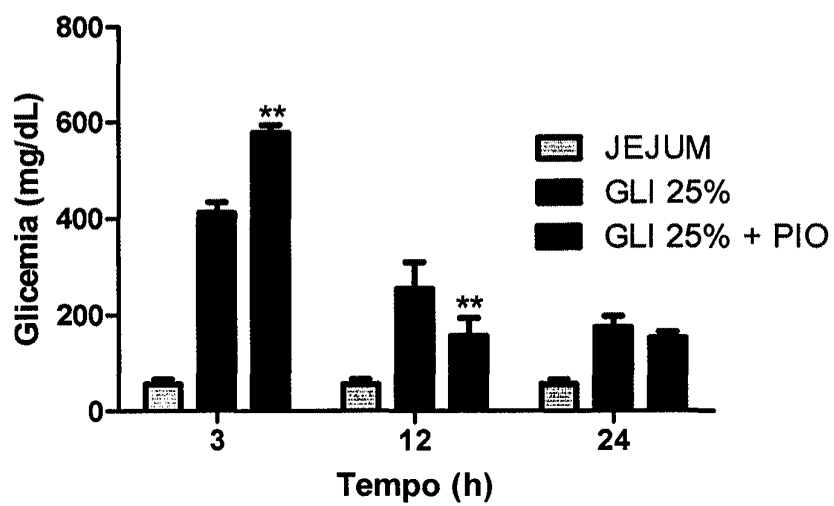


Figura 8

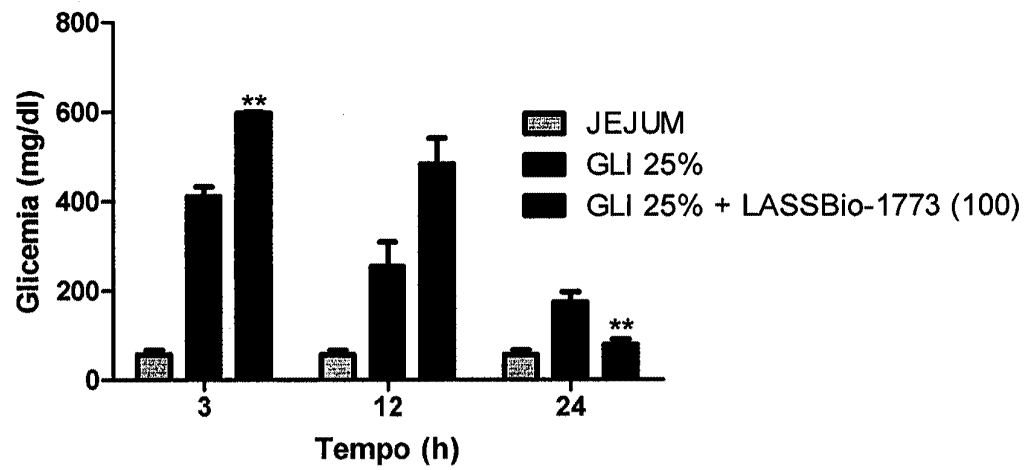


Figura 9

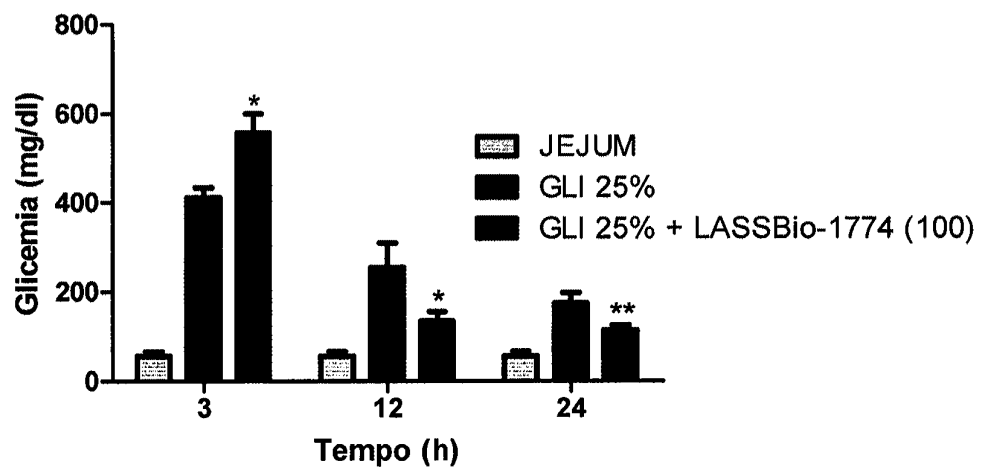


Figura 10

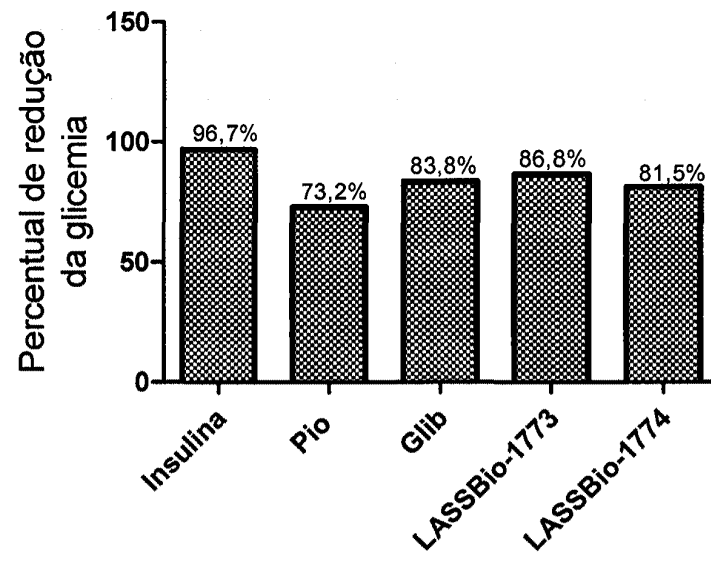


Figura 11

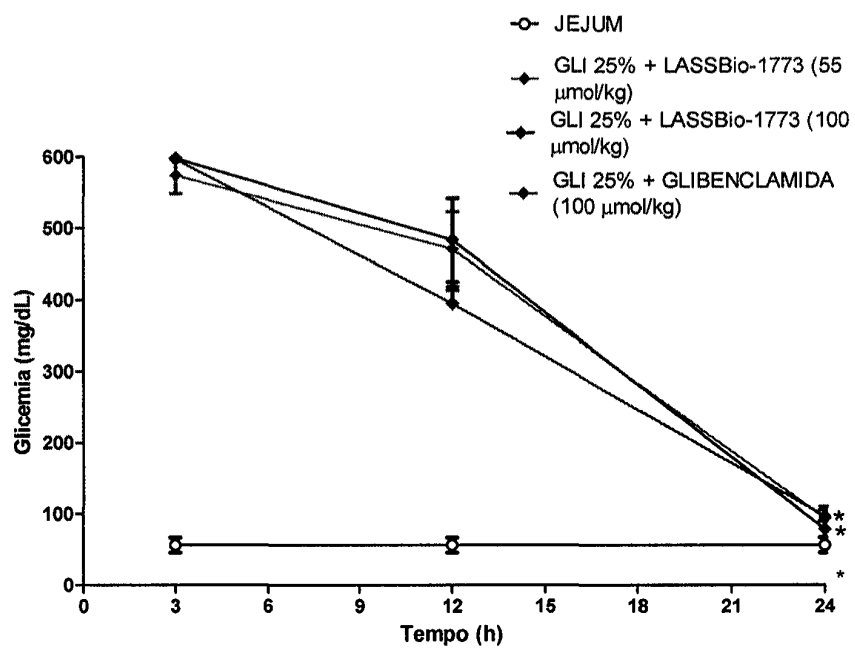


Figura 12

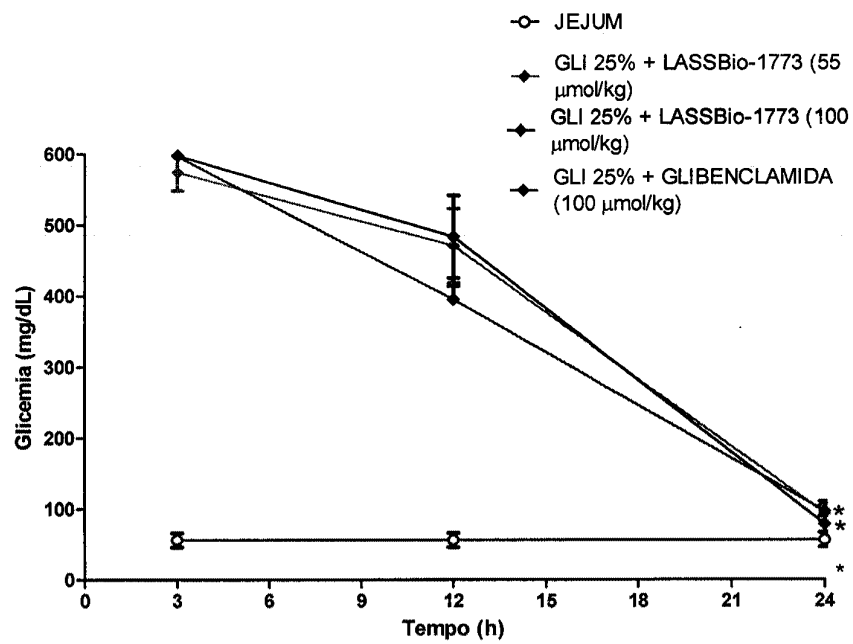


Figura 13

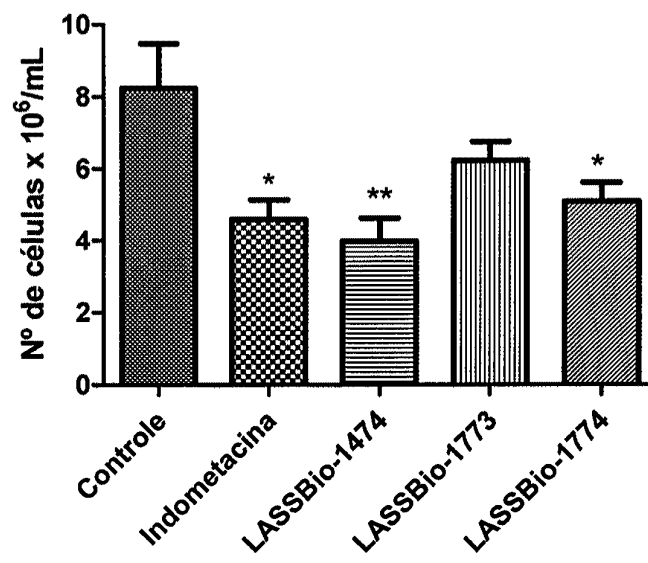


Figura 14

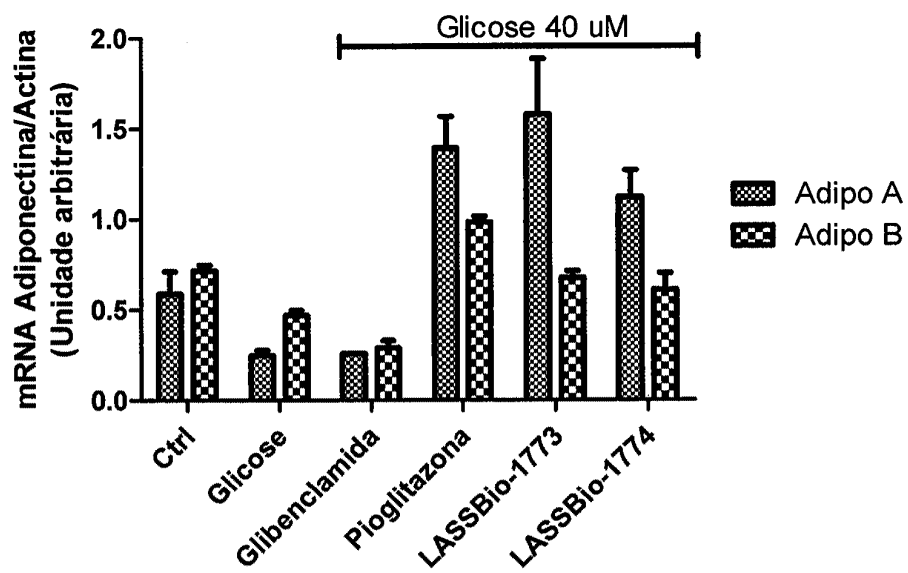


Figura 15

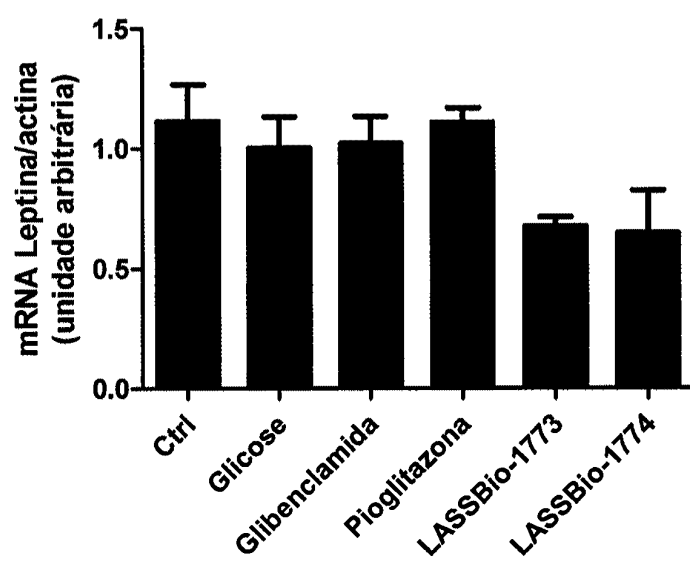


Figura 16

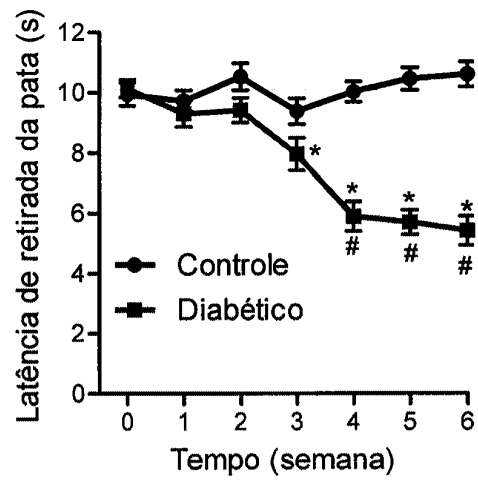


Figura 17A

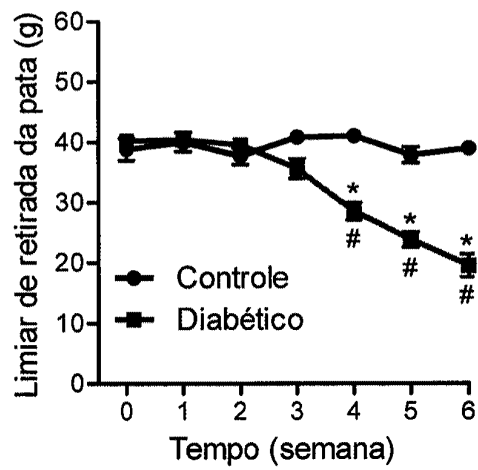


Figura 17B

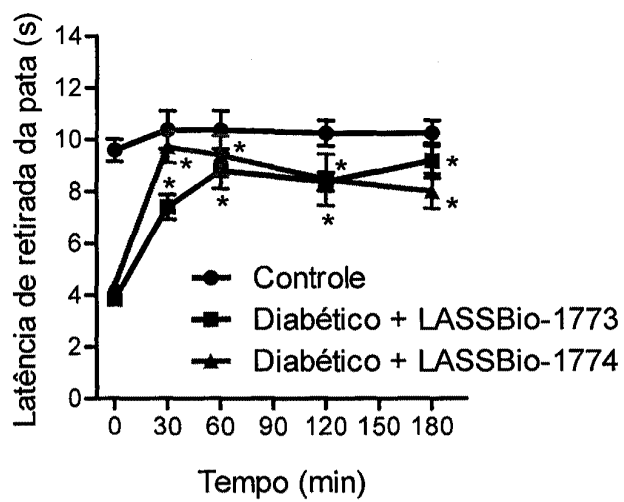


Figura 18A

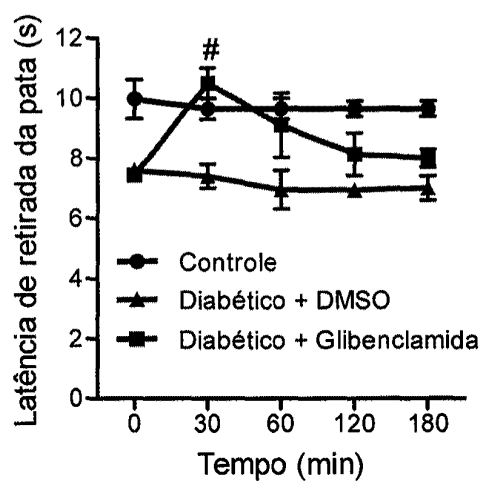


Figura 18B

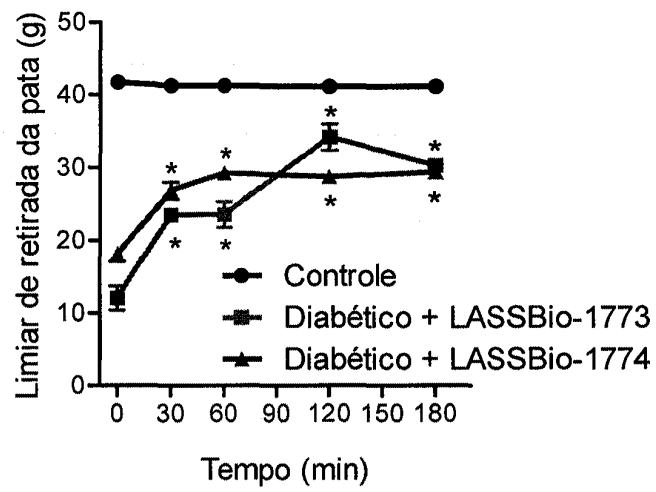


Figura 19A

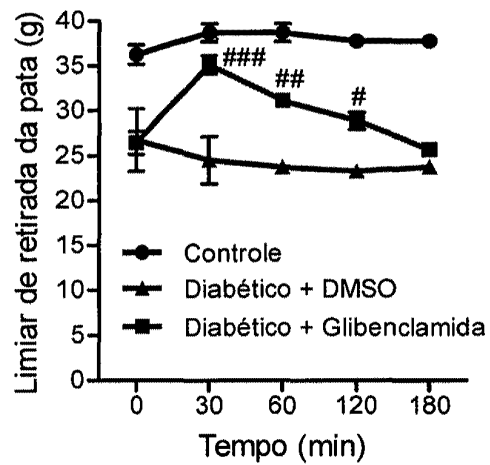
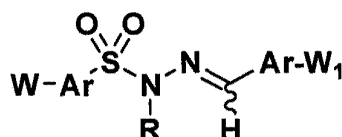


Figura 19B

Resumo

COMPOSTO SULFONILIDRAZÔNICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DO COMPOSTO SULFONILIDRAZÔNICO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

- 5 A presente invenção descreve um composto de fórmula (I), seu processo de obtenção e uso na fabricação de uma composição farmacêutica para estimular a produção de insulina. Especificamente, a presente invenção compreende uma série de sulfonilidrazonas que podem ser utilizadas na fabricação de uma composição farmacêutica para tratar diabetes. A presente
- 10 invenção se situa nos campos da farmácia e da química.



Fórmula I